

Desenvolvimento e Otimização de Sensores Eletroquímicos Impressos

Vanessa Montês

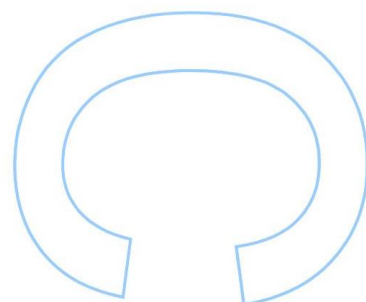
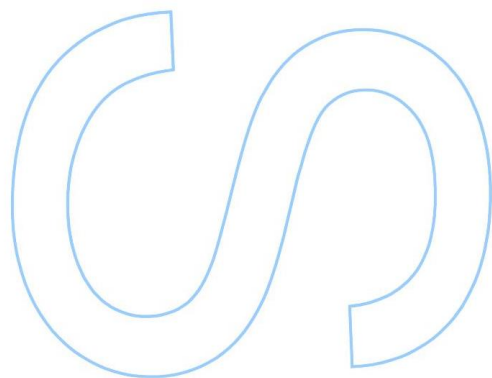
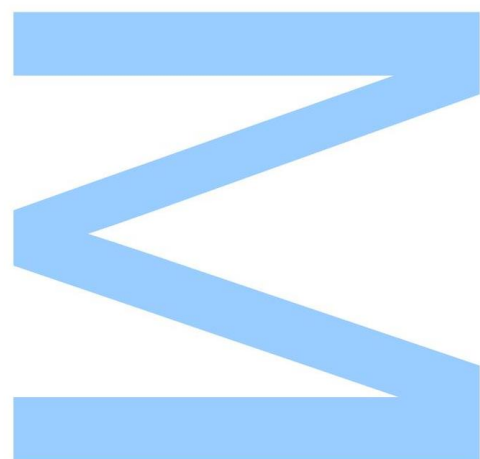
Mestrado em Química
Departamento de Química e Bioquímica
2015

Orientador

M. João Sottomayor, FCUP

Orientadores de Estágio

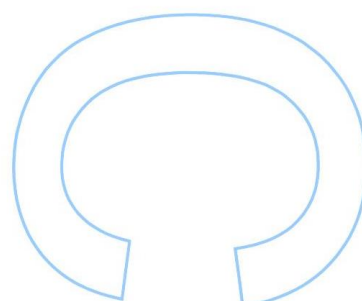
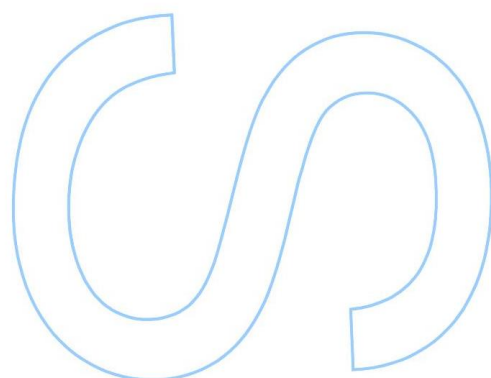
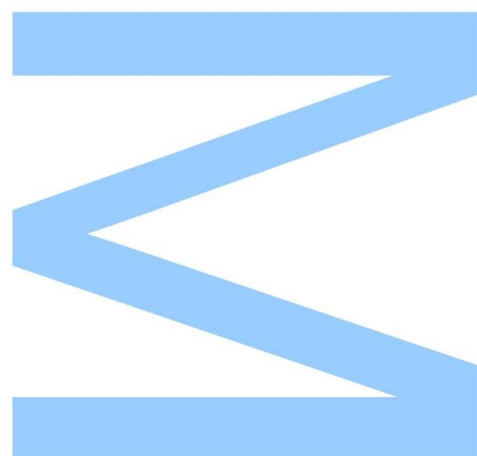
Joana Dinis Fonseca, CeNTI
José Poças Gonçalves, CeNTI





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

A realização desta tese de Mestrado apenas foi possível graças à ajuda de diversas pessoas e instituições, às quais gostaria de deixar as minhas palavras de agradecimento:

Ao Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, por me ter aceite como estudante de Mestrado, permitindo-me a realização da tese de Mestrado em ambiente empresarial.

Ao CeNTI, Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes, por me ter aceitado e possibilitado a realização deste trabalho de investigação e desenvolvimento, colocando todos os meios necessários à minha disposição.

À Doutora Joana Fonseca e ao Doutor José Gonçalves, meus orientadores no CeNTI, por todo o apoio, orientação, dedicação e tempo dispensados a ajudar-me durante todo o presente trabalho. Obrigada por todo o apoio nas discussões de resultados e possíveis “voltas a dar”.

À Professora Doutora M. João Sottomayor, pela ajuda imprescindível durante as diversas apresentações e trabalhos escritos.

Aos meus colegas estagiários por todo o apoio durante este último ano, tanto em forma de longas discussões de resultados obtidos, como de grandes gargalhadas que serviam para levantar os ânimos. Especialmente ao Roman Krupa, pelas longas discussões de física e por me ter auxiliado durante a utilização de diferentes equipamentos de caracterização elétrica, ajudando-me na análise dos seus resultados.

A todos os funcionários do CeNTI, que me fizeram sentir em casa e que estavam sempre prontos a ajudar no que era necessário.

Ao Rodrigo Coelho, por ter estado sempre ao meu lado a apoiar-me e pronto a ouvir as minhas inúmeras e intermináveis teorias durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais e irmãos um grande obrigada por todo o apoio e sacrifícios feitos, por todas as longas conversas e por toda a ajuda.

Resumo

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento e otimização de sensores eletroquímicos impressos não modificados e modificados, para detecção de peróxido de hidrogénio e de etanol.

Os sensores eletroquímicos são conhecidos pela sua elevada sensibilidade e seletividade para diversos analitos, não sendo necessário a utilização de elevados volumes de amostra para a realização das análises. Por sua vez os sensores impressos geralmente têm um baixo custo de produção associado, e essa produção pode realizar-se em massa.

Neste trabalho procedeu-se à impressão dos sensores estudados utilizando-se a técnica de serigrafia (*screen printing*). Após a impressão, realizaram-se estudos de caracterização eletroquímica e elétrica do eletrodo de trabalho, estudando-se o processo de oxidação-redução de uma sonda eletroquímica ($K_3[Fe(CN)_6]$) à superfície do eletrodo e determinando-se a resistência de folha. Adicionalmente também se determinou a espessura e a rugosidade dos eletrodos por perfilometria.

Com o objetivo de se obter um aumento da reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do eletrodo, foram feitos estudos de otimização do sensor. No primeiro estudo investigou-se como o número de camadas de carbono no eletrodo de carbono afeta o comportamento eletroquímico, a resistência de folha e a rugosidade do próprio eletrodo. No segundo estudo, investigou-se qual a influência de pré-tratamentos eletroquímicos, com soluções de H_2SO_4 , e PBS no comportamento eletroquímico do eletrodo de trabalho.

Após a otimização do eletrodo de trabalho, procedeu-se à modificação da superfície desse eletrodo com ftalocianina de cobalto (CoPC), um mediador de eletrões que permite a detecção do sinal eletroquímico de H_2O_2 .

Foi também objetivo do presente trabalho a imobilização, sobre o eletrodo de trabalho do sensor, da enzima álcool oxidase, uma enzima que catalisa a reação de álcoois primários com oxigénio, sendo um dos produtos H_2O_2 . Com esta modificação pretendia-se obter sensores para a detecção de etanol, sensores com uma vasta aplicação industrial nomeadamente na monitorização dos processos de fermentação de bebidas alcoólicas e de produção de etanol para biocombustíveis. A imobilização realizou-se por deposição por gota, tendo-se testado três abordagens distintas. Com uma membrana de nitrocelulose, com uma camada de ágar-ágar e sem membrana de nitrocelulose e/ou camada de ágar-ágar. Apenas os sensores com a camada de ágar-ágar sobre a gota de álcool oxidase apresentaram sensibilidade ao etanol, no entanto, esta foi muito baixa.

Palavras-chave

Sensores eletroquímicos impressos, Biossensores, Serigrafia, Ftalocianina de cobalto(II), Etanol, Álcool oxidase, Hexacianoferrato(III) de potássio.

Abstract

The main aim of this work is the development and optimization of an electrochemical printed sensor, without or with modification, to detect hydrogen peroxide and ethanol.

Electrochemical sensors are known for their high sensitivity and selectivity for different analytes and they don't necessarily need high volume samples. Generally printed sensors have low production cost and are easily adapted to mass production.

The studied sensors were printed by the screen printing technique. Afterwards, the working electrode was electrochemically and electrically characterized in order to evaluate its electrochemical behavior, using an electrochemical probe ($K_3[Fe(CN)_6]$), and to determine its sheet resistance. Additionally, the thickness and roughness of the electrode were also evaluated, by surface profilometry.

For an increase of the reversibility of the redox process at the working electrode surface, optimization studies were performed. In the first study the number of carbon layers, and its effect on the electrochemical behavior, the sheet resistance and the roughness of the electrode, were analyzed. In the second study, the influence of two different pre-treatments, one with H_2SO_4 and the other with PBS, on the electrochemical behavior of the electrode were investigated.

After the working electrode optimization, an electrode surface modification was carried out, with cobalt phthalocyanine (CoPC), an electron mediator which allows the detection of the electrochemical signal of H_2O_2 . The modified sensor showed a linear electrochemical response with the H_2O_2 concentration.

In the present work we wanted to immobilize, onto the working electrode of the sensor, the enzyme alcohol oxidase, which catalyzes the reaction of the primary alcohols with hydrogen, one of the products of H_2O_2 reaction (an electrochemical species with high oxidation potential). With this modification it was intended to obtain a sensor, for the detection of ethanol, with a wide range of industrial applications, like the monitorization of the alcohol fermentation and the production of ethanol for biofuels.

The immobilization was carried out by drop deposition, and three different approaches were tested: with a nitrocellulose membrane, with an agar membrane and without a nitrocellulose membrane and/or an agar membrane. Only the sensor with the agar membrane onto the alcohol oxidase drop showed sensibility to ethanol, however, it was really small.

Keywords

Screen printed electrochemical sensors, Biosensor, Screen printing, Cobalt phthalocyanine, Ethanol, Alcohol oxidase, Potassium ferricyanide(III).

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Palavras-chave	iv
Abstract	v
Keywords	vi
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Índice de Gráficos	xiii
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xv
1. Introdução	1
1.1. Biossensores	1
1.2. Sensores Eletroquímicos	3
1.2.1. Sensores Biocatalíticos	5
1.2.2. Sensores por Afinidade	6
1.2.3. Exemplos de Biossensores	6
1.3. Detecção de Etanol	7
1.3.1. Álcool Desidrogenase	8
1.3.2. Álcool Oxidase	8
1.3.3. Ftalocianina de Cobalto(II)	9
1.4. Principais Objetivos	10
2. Técnicas	13
2.1. Fabrico de Sensores Eletroquímicos	13
2.1.1. Técnicas de Impressão	13
2.1.1.a. Serigrafia	13
2.1.1.b. Impressão a Jato de Tinta	15
2.1.1.c. Rotogravura	16
2.1.1.d. Flexografia	17
2.1.2. Materiais	17
2.1.3. Substratos	18
2.1.4. <i>Design</i>	19
2.1.5. Funcionalização de Eléttodos	20
2.2. Caracterização de Sensores Eletroquímicos	23
2.2.1. Técnicas Eletroquímicas	23
2.2.1.a. Voltametria Cíclica	23
2.2.1.b. Cronoamperometria	28

2.2.2. Técnicas de Caracterização Elétrica	29
2.2.2.a. Resistência de folha	29
2.2.2.b. Perfilometria	30
3. Execução Experimental	31
3.1. Solventes e Reagentes	31
3.2. Impressão de sensores	31
3.3. Caracterização do Elétrodo de Trabalho	32
3.3.1. Caracterização Elétrica pelo Método de Duas Pontas	32
3.3.2. Perfilometria	32
3.3.3. Caracterização Eletroquímica	32
3.4. Modificação do Elétrodo de Trabalho com CoPC	33
3.5. Modificação do Elétrodo de Trabalho com AOX	33
4. Impressão de sensores	35
4.1. <i>Design</i>	35
4.2. Constituição dos sensores impressos	36
4.3. Implementação da Técnica	37
4.4. Alinhamento	38
5. Otimização e Caracterização do Elétrodo de Trabalho	41
5.1. Pré-tratamento	41
5.2. Revestimento	43
5.3. Variação da Espessura do Elétrodo de Trabalho	45
5.3.1. Caracterização Eletroquímica	46
5.3.2. Caracterização Elétrica	47
5.4. Sistemas de Três Elétrodos Impressos	49
5.4.1. Pré-tratamento	49
5.4.2. Estudo da Estabilidade	54
5.4.3. Estudo Cinético	55
6. Modificação do Elétrodo de Trabalho	59
6.1. Ftalocianina de Cobalto	59
6.1.1. Pré-tratamento	59
6.1.2. Estudo da Estabilidade	63
6.1.3. Estudo Cinético	65
6.1.4. Detecção de H ₂ O ₂	67
6.2. Álcool Oxidase	70
6.2.1. Detecção de Etanol	71
7. Conclusão	73
8. Bibliografia	75

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema de um biossensor com um transdutor de sinal	1
Figura 2 – Tabela resumo dos diversos tipos de biossensores de acordo com o tipo de elemento de reconhecimento biológico ou do género de transdutor utilizado.....	2
Figura 3 – Esquema de um sistema de três eléctrodos e respetivos componentes.	4
Figura 4 – SPEs e respetivos componentes.....	4
Figura 5 – A – SPE de um sistema de três eléctrodos e respetivos componentes. B – Célula eletroquímica de um sistema de três eléctrodos.	5
Figura 6 – Fórmula da ftalocianina de cobalto(II).	9
Figura 7 – Esquema adaptado das reações que ocorrem na superfície do eléctrodo de trabalho, para deteção e quantificação de peróxido de hidrogénio	10
Figura 8 – Ilustração do processo de serigrafia.....	13
Figura 9 – Fotografias dos aparelhos das técnicas de serigrafia.....	15
Figura 10 – Ilustração do processo de impressão a jato de tinta.....	16
Figura 11 – Ilustração de dois processos de rolo a rolo	16
Figura 12 – Métodos de funcionalização de eléctrodos impressos biológicos.....	21
Figura 13 – Métodos de imobilização do elemento de reconhecimento biológico no eléctrodo impresso, aquando da preparação de um biossensor	21
Figura 14 – Sinal de excitação de uma voltametria cíclica	24
Figura 15 – Voltamograma cíclico típico para um sistema reversível	25
Figura 16 – Voltamograma cíclico típico para um sistema irreversível.	27
Figura 17 – Efeito do aumento da velocidade de varrimento.....	28
Figura 18 – a – Perfil do potencial aplicado ao longo do tempo. b – Variação da intensidade da corrente ao longo do tempo, cronoamperograma.....	29
Figura 19 – Fotografia do sensor impresso após ter sido colocada uma membrana de nitrocelulose sobre o sensor e seguidamente um filme plástico adesivo.	34
Figura 20 – Desenho técnico do sensor e respetivas medidas em milímetros.	35
Figura 21 – <i>Design</i> dos padrões que compõem o sensor.	36
Figura 22 – <i>Design</i> do sensor após a sobreposição dos diferentes padrões, utilizando uma tinta diferente por padrão.	36
Figura 23 – Processo de alinhamento e impressão dos sensores, pela técnica de serigrafia.....	37
Figura 24 – Perfil representativo de um sensor com quatro camadas distintas de carbono sobrepostas.	38
Figura 25 – Medição da distância entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo auxiliar, recorrendo à técnica de microscopia ótica.	39

Figura 26 – Elétrodo de trabalho impresso.	43
Figura 27 – Elétrodo de trabalho impresso com revestimento.....	44
Figura 28 – Sistema de três elétrodos impressos.....	49
Figura 29 – Imagens obtidas por microscopia ótica do elétrodo de trabalho do sensor impresso.	54
Figura 30 – Imagens obtidas por microscopia ótica do elétrodo de trabalho do sensor impresso.	63
Figura 31 – Sensor de três elétrodos	71

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Exemplos de biossensores e respetivos mecanismos.....	7
Tabela 2 – Exemplos de algumas das principais tintas e respetivas vantagens e desvantagens	18
Tabela 3 – Exemplos de alguns dos principais substratos e respetivas vantagens e desvantagens	18
Tabela 4 – Dimensões de diferentes biossensores impressos, por marca	20
Tabela 5 – Constituição dos sensores impressos.	36
Tabela 6 – Valores da largura dos diferentes patamares representativos das diversas camadas de tinta à base de carbono, representados no Gráfico 1.....	39
Tabela 7 – Valores de corrente obtidos para os picos anódico ($i_{p,a}$) e catódico ($i_{p,c}$) e respetivos valores de potencial, referentes ao Gráfico 11.....	51
Tabela 8 – Valores de corrente obtidos para os picos anódico ($i_{p,a}$) e catódico ($i_{p,c}$) e respetivos valores de potencial, referentes ao Gráfico 12.	52
Tabela 9 – Valores de corrente obtidos para os picos anódico ($i_{p,a}$) e catódico ($i_{p,c}$) e respetivos valores de potencial, referentes ao Gráfico 17.....	60
Tabela 10 – Valores de corrente obtidos para os picos anódico ($i_{p,a}$) e catódico ($i_{p,c}$) e respetivos valores de potencial, referentes ao Gráfico 18.....	61

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Perfilometria referente ao alinhamento do eletrodo de trabalho com sobreposição de quatro camadas	38
Gráfico 2 – Resultado do teste inicial do sensor de três eletrodos impressos	41
Gráfico 3 – Voltamogramas após pré-tratamento.....	42
Gráfico 4 – Voltamograma obtido com eletrodo de carbono impresso sem revestimento, com picos representativos de metais	44
Gráfico 5 - Voltamograma obtido com eletrodo de carbono impresso com revestimento.	45
Gráfico 6 – Voltamogramas obtidos com variação do número de camadas, de tinta à base de carbono, do eletrodo de trabalho impresso e eletrodo de carbono vítreo comercial.	46
Gráfico 7 – Aumento da espessura do eletrodo de trabalho impresso em função do número de camadas impressas.	47
Gráfico 8 – Aumento da resistência de folha do eletrodo de trabalho impresso em função do inverso da espessura.	47
Gráfico 9 – Variação da rugosidade do eletrodo de trabalho impresso em função do número de camadas impressas.	48
Gráfico 10 – Voltamogramas obtidos com sistema de três eletrodos impressos antes e após pré-tratamento	50
Gráfico 11 – Voltamogramas obtidos com sistema de três eletrodos impressos antes e após pré-tratamento.	51
Gráfico 12 - Voltamogramas obtidos com solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 por três sensores diferentes	52
Gráfico 13 – Voltamogramas representativos de cada conjunto de 100 varrimentos, cada cor corresponde a um desses voltamogramas.	55
Gráfico 14 – Voltamogramas obtidos no estudo cinético da solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 a diferentes velocidades de varrimento.....	56
Gráfico 15 – Variação do valor de corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento	56
Gráfico 16 – Variação dos valores de potencial dos picos anódico e catódico em função da velocidade de varrimento	57
Gráfico 17 – Voltamogramas obtidos em solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4.	60

Gráfico 18 – Voltamogramas obtidos em solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 por três sensores diferentes	61
Gráfico 19 – Voltamogramas representativos de cada conjunto de 100 varrimentos, cada cor corresponde a um desses voltamogramas.	64
Gráfico 20 – Voltamogramas obtidos com intervalo de uma semana utilizando o mesmo sensor, que fora submetido a um pré-tratamento apenas uma vez.	65
Gráfico 21 – Voltamogramas obtidos no estudo cinético da solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 a diferentes velocidades de varrimento.....	66
Gráfico 22 – Variação do valor de corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento.....	66
Gráfico 23 – Variação dos valores de potencial dos picos anódico e catódico em função da velocidade de varrimento	67
Gráfico 24 – Detecção de 0,88 mM H ₂ O ₂ em 0,1 M PBS pH=7,4.....	68
Gráfico 25 – Sinal amperométrico do sensor após sucessivas adições padrão de H ₂ O ₂	69
Gráfico 26 – Curva de calibração do sinal amperométrico do sensor após sucessivas adições padrão de H ₂ O ₂	69
Gráfico 27 – Curva de calibração do sinal amperométrico do sensor após sucessivas adições padrão de etanol	72

Lista de Símbolos e Abreviaturas

A - Área do eletrodo de trabalho

A_t - Área transversal

ADH - Álcool desidrogenase

AOX - Álcool oxidase

c - Concentração

CoPC - Ftalocianina de cobalto

D - Coeficiente de difusão

E - Potencial do eletrodo de trabalho

E^\ominus - Potencial formal

E_A - Eletrodo auxiliar

E_R - Eletrodo de referência

E_T - Eletrodo de trabalho

$E_{p,a}$ - Potencial de pico da corrente anódica

$E_{p,c}$ - Potencial de pico da corrente catódica

e^- - Eletrão

ΔE_p - Diferença de potencial entre os picos anódico e catódico

F - Constante de Faraday

i - Intensidade de corrente

i_c - Corrente capacitiva

i_f - Corrente faradaica

i_p - Intensidade de corrente de pico

$i_{p,a}$ - Intensidade de corrente do pico anódico

$i_{p,c}$ - Intensidade de corrente do pico catódico

K_M - Constante de Michaelis-Menten

l - Comprimento

n - Quantidade de substância (analito)

n' - Número de elétrons transferidos no passo limitante da velocidade

NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleótido

$[O]_\infty$ - Concentração inicial da espécie oxidante em solução

PET- Politereftalato de etileno

PVC- Policloreto de polivinilo

PBS - *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

Q - Quociente entre a concentração das espécies em solução

R - Resistência

R_s - Resistência de folha

redox - Redução - oxidação

R^2 - Coeficiente de determinação

R - Constante dos gases perfeitos

SPE - *Screen printed electrode* (elétrodo impresso)

SPCE - *Screen printed carbon electrode* (elétrodo de carbono impresso)

$[S]_0$ - Concentração inicial de substrato

T - Temperatura

t - Tempo

v - Velocidade de varrimento

V_0 - Velocidade inicial

V_M - Velocidade máxima

α_a - Coeficiente de transferência de carga anódico

α_c - Coeficiente de transferência de carga catódico

ρ - Resistividade

\varnothing - Diâmetro

1. Introdução

1.1. Biossensores

Um biossensor é um sensor de deteção química que na sua constituição tem um componente de reconhecimento biológico, que é o responsável pela biosseletividade, acoplado a um transdutor, que transforma a informação obtida num sinal de interesse, sendo desta forma possível a deteção de um determinado parâmetro bioquímico [2]. A Figura 1 apresenta esquematicamente os elementos constituintes de um biossensor. O elemento de reconhecimento biológico poderá ser acoplado ao sensor por técnicas de funcionalização, como por exemplo adsorção e *cross linking*.

A área dos biossensores encontra-se em grande expansão devido, em particular, à sensibilidade inerente aos métodos utilizados (como por exemplo métodos eletroquímicos) em conjunto com a biosseletividade característica dos componentes biológicos [2].

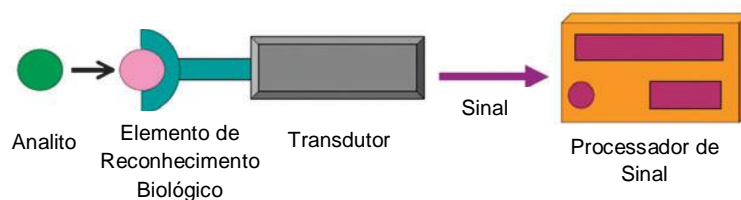


Figura 1 – Esquema de um biossensor com um transdutor de sinal [2].

Existem diversos tipos de biossensores, podendo a designação atribuída a cada um depender do tipo de elemento de reconhecimento biológico (biocatalítico ou por afinidade) ou do género de transdutor utilizado (ressonante, térmico, ótico, sensível a iões ou eletroquímico), tal como se encontra esquematizado na Figura 2.

Os biossensores apresentam tipicamente dimensões muito reduzidas, são de fácil utilização e permitem uma análise rápida dos mais variados analitos. Esta análise pode ser contínua, durante um longo período de tempo, ou pode ser uma análise de resposta rápida, durante um curto período de tempo [3]. Dependendo do objetivo para o qual é idealizado, o sensor pode ser descartável ou reutilizável.

O acoplamento de um elemento de reconhecimento biológico ao transdutor confere uma elevada especificidade a este tipo de sensores e o transdutor permite uma elevada sensibilidade para o analito. Sendo estes sensores específicos para determinados compostos, encontram-se otimizados para que o seu tempo de resposta seja o mais curto possível, o que se deve à manipulação da cinética das reações que ocorrem no sistema [3].

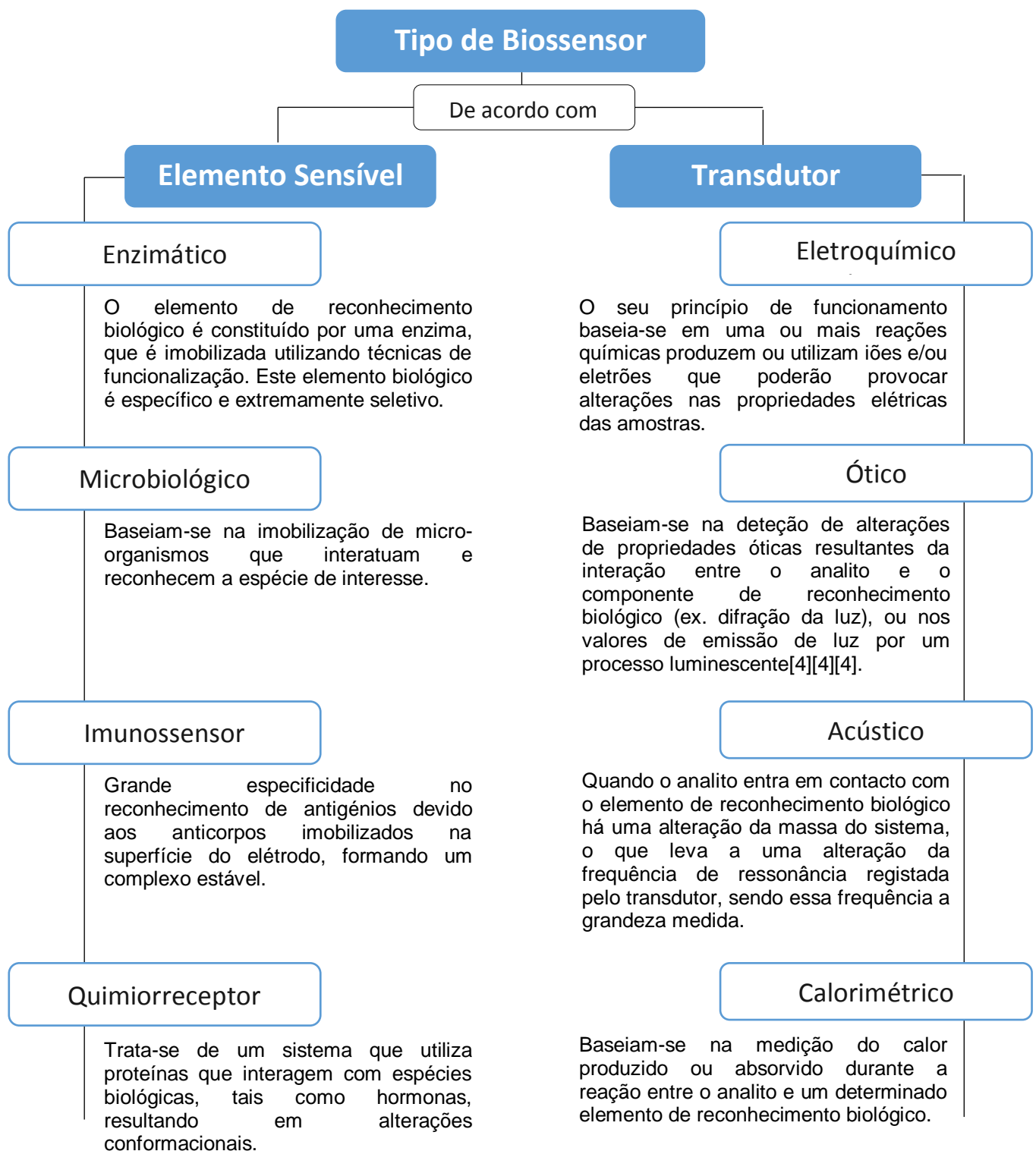


Figura 2 – Tabela resumo dos diversos tipos de biossensores de acordo com o tipo de elemento de reconhecimento biológico ou do género de transdutor utilizado [4].

Apesar das inúmeras vantagens, os biossensores apresentam também algumas desvantagens. Devido à incorporação de um agente biológico no sensor, em geral, a temperatura de acondicionamento deve ser controlada, já que quando sobreaquecido existe o risco de desnaturação do agente biológico acoplado. Dessa forma, a sua estabilidade é um parâmetro crítico, existindo diversos fatores que poderão pô-la em causa, tais como o pH, iões em solução e, como já referido, a temperatura [3].

1.2. Sensores Eletroquímicos

Esta é provavelmente a maior classe de sensores químicos, sendo utilizados na deteção das mais diversas moléculas, micro-organismos, entre outros. O princípio inerente é que uma ou mais reações químicas acabam por produzir ou utilizar iões e/ou eletrões que provocam alterações nas propriedades elétricas das amostras. Este tipo de sensores divide-se em três categorias, os sensores condutimétricos, amperométricos e potenciométricos [4].

Os sensores eletroquímicos condutimétricos baseiam-se em processos químicos que ocorrem em solução e que levam a uma alteração da condutividade iónica das soluções. Em geral a sensibilidade para esta variável é muito baixa [4].

Outra classe de sensores eletroquímicos são os amperométricos em que é medida a intensidade de corrente após a aplicação de uma diferença de potencial, que dá origem à reação química. Estes sensores têm uma grande sensibilidade para amostras biológicas e geralmente detetam com facilidade espécies eletroativas presentes nas amostras [4]. Estes sensores eletroquímicos são, por norma, sistemas eletroquímicos de três elétrodos, como a célula eletroquímica esquematizada na Figura 3. Este sistema de três elétrodos consiste na passagem de corrente de um eléctrodo de trabalho, no qual ocorre a reação eletroquímica em estudo, para um eléctrodo auxiliar. O eléctrodo de referência é utilizado como uma referência de potencial conhecido e constante [5].

Por último, tem-se os sensores eletroquímicos potenciométricos, em que é medida a diferença de potencial entre um eléctrodo sensível ao analito e o eléctrodo de referência.

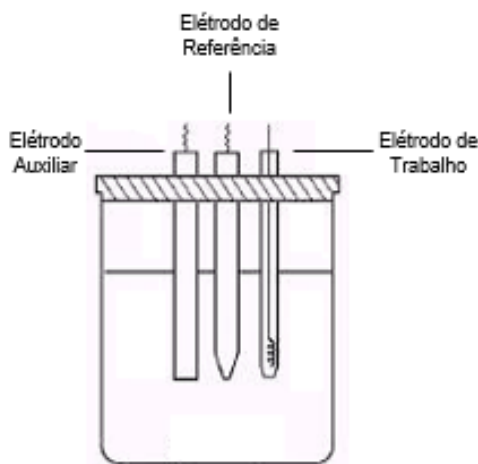


Figura 3 – Esquema de um sistema de três eletrodos e respectivos componentes.

Os eletrodos dos sensores eletroquímicos podem ser impressos, nomeadamente por serigrafia. A este sistema chama-se sistema de eletrodos impressos, SPE (*Screen Printed Electrode*), e existem sistemas de dois ou três eletrodos, tal como representado na Figura 4. Os SPEs com dois eletrodos costumam ser utilizados para deteção sem quantificação. Os SPEs de três eletrodos são, por sua vez, mais versáteis, permitindo a realização de análises quantitativas. Por serem sistemas mais complexos, têm associado um maior custo de fabrico.

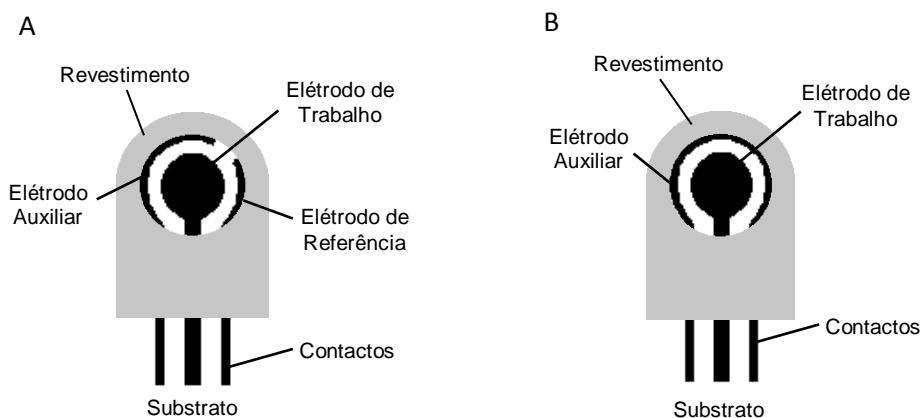


Figura 4 – SPEs e respectivos componentes. A) Esquema de um sistema de três eletrodos. B) Esquema de um sistema de dois eletrodos.

A grande diferença entre as células eletroquímicas convencionais e os SPEs é que estes últimos são mais versáteis, de menores dimensões e complexidade, tal como é possível observar na Figura 5 [3]. Tais características permitem que os SPEs possam ser utilizados por operadores não especializados, não existindo a necessidade de preparar a célula eletroquímica, bastando proceder à deposição da amostra sobre o eletrodo de trabalho do sensor. Apesar desta facilidade adicional na utilização de sensores impressos, as células eletroquímicas convencionais têm a vantagem de

serem sistemas mais robustos, permitindo, através do polimento, limpar o eletrodo de trabalho de todas as impurezas que poderão estar na sua superfície, o que possibilita que o sistema tenha uma maior durabilidade e estabilidade.

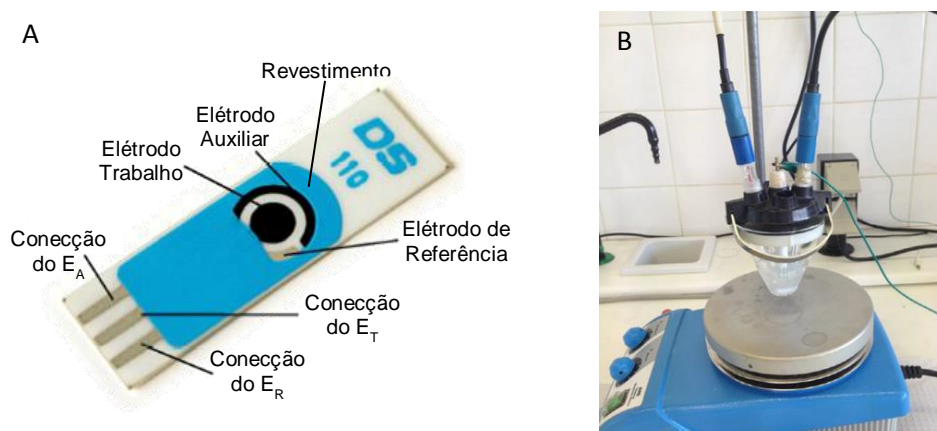


Figura 5 – A – SPE de um sistema de três eléctrodos e respetivos componentes [6]. B – Célula eletroquímica de um sistema de três eléctrodos.

Existem sensores eletroquímicos biológicos, a que se dá o nome de biossensores eletroquímicos e que podem ser classificados com base no seu elemento de reconhecimento biológico, denominando-se de sensores biocatalíticos ou sensores por afinidade. A grande diferença entre ambos é que, no caso dos sensores biocatalíticos, ocorre uma reação entre o analito e o componente de reconhecimento biológico, havendo a formação de uma nova espécie química, sendo o sinal da nova espécie o que é monitorizado. Já no caso dos sensores por afinidade é a ligação entre o analito e o componente biológico que é detetada.

1.2.1. Sensores Biocatalíticos

Nos sensores biocatalíticos são geralmente usadas enzimas que são acopladas ao eletrodo de trabalho. Estas têm uma grande atividade catalítica aliada a uma elevada especificidade para determinadas espécies, catalisando a formação de produtos eletroativos para serem detetados. Estes produtos são, em geral, monitorizados diretamente através da técnica de amperometria [2].

Para além de sensores biocatalíticos baseados em enzimas, existem também biossensores em que são incorporados, no componente de reconhecimento biológico, micro-organismos vivos. Este tipo de sensor não é muito utilizado, pois tem o problema de precisar de longos períodos de tempo para recuperar totalmente após uma análise, apresentando longos tempos de resposta e perda de sensibilidade ao

longo do tempo [2]. Apesar disso, têm a vantagem de serem extremamente específicos para o analito em causa.

Apesar da crescente utilização de sensores biocatalíticos, é necessário ter em conta diversos parâmetros durante a sua elaboração, nomeadamente a nível do componente de reconhecimento biológico, tal como a sua disponibilidade, estabilidade em armazenamento e durante a utilização, pH e temperatura. Este tipo de sensores também têm alguns problemas associados, tal como o número limitado de enzimas comerciais específicas disponíveis, o que diminui o número possível de biossensores, e a substituição periódica, obrigatória, da camada enzimática funcionalizada no biossensor, pois as enzimas têm um tempo de vida limitado [2].

Apesar desses problemas, este tipo de biossensores costuma oferecer *designs* simples, não necessitando de instrumentação muito cara para serem utilizados. São assim de fácil utilização, compactos e económicos, sendo uma solução cada vez mais utilizada [2].

1.2.2. Sensores por Afinidade

Os sensores por afinidade baseiam-se na formação de ligações entre o analito e o componente de reconhecimento biológico, utilizando biomoléculas (como por exemplo anticorpos, recetores de membranas celulares ou oligonucleótidos) com uma grande seletividade e que formam ligações fortes. A ligação depende essencialmente da complementaridade entre o analito e o centro ativo do componente biológico, quer em tamanho como em forma, o que permite uma elevada seletividade e sensibilidade. Este método é muito utilizado na monitorização da qualidade alimentar e na deteção de substâncias biológicas. Os ensaios mais comuns são os imunológicos. Os sensores utilizados nestes ensaios são designados por imunossensores e em geral caracterizam-se por apresentarem baixos limites de deteção e grande seletividade [2].

1.2.3. Exemplos de Biossensores

Apesar de ser uma área ainda em expansão, já se encontram desenvolvidos diversos biossensores eletroquímicos, sendo um dos mais conhecidos o utilizado para a deteção de glicose. Este é um dos biossensores biomédicos mais populares, utilizado para monitorizar níveis de glicose no sangue em pessoas com diabetes [3 - 5].

Para além da sua utilização na área biomédica, os biossensores eletroquímicos são também utilizados para controlo de qualidade, especialmente na indústria alimentar e agrícola, para deteção de aditivos nas amostras ou determinação do nível

de poluentes, respetivamente [7]. Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos de biossensores.

Tabela 1 – Exemplos de biossensores e respetivos mecanismos.

Substrato	Enzima	Espécie detetada/ quantificada	Reação	Referência
Glicose	Glicose oxidase	H ₂ O ₂	$\text{Glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Glicose oxidase}} \text{Ácido Glucónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^-$	[10]
Glicose	Glicose 6-fosfato desidrogenase	NADPH	$\text{Glicose-6-fosfato} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{Gluconato-6-fosfato} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	[11]
Glutationa	Glutationa Peroxidase	H ₂ O ₂	$2\text{Glutationa Reduzida (GSH)} \xrightarrow{\text{Glutationa peroxidase}} \text{Glutationa Oxidada (GSSG)}$	[12]
Ácido Úrico	Urato Oxidase	H ₂ O ₂	$\text{Ácido úrico} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Urato Oxidase}} 5\text{-hidroxisourato} + \text{H}_2\text{O}_2$	[13]
DOPA	Tirosinase	O ₂	$\text{Tirosina} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Tirosinase}} \text{Levodopa (DOPA)}$	[14]
Ácido Acético	Álcool Oxidase	O ₂	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Álcool Oxidase}} \text{Acetaldeído} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$	[15]
Glutamato	Glutamato descarboxilase	CO ₂	$\text{Glutamato} \xrightarrow{\text{Glutamato descarboxilase}} \text{CO}_2 + \alpha\text{-cetoglutarato}$	[16]
Álcool	Álcool desidrogenase	NADH	$\text{Etanol} \xrightarrow{\text{NAD}^+} \text{Acetaldeído}$	[17]
Colesterol	Colesterol oxidase	H ₂ O ₂	$\text{Colesterol} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Colesterol Oxidase}} 4\text{-Colesteno} + \text{H}_2\text{O}_2$	[18]
Glutamina	Glutaminase	NH ₄ ⁺	$\text{Glutamina} \xrightarrow{\text{Glutaminase}} \text{Glutamato}$	[19]
Creatinina	Creatiminase	NH ₄ ⁺	$\text{Creatinina} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Creatiminase}} 1\text{-metilimidazolidina-2,4-diona}$	[20]
Ureia	Urease	H ⁺	$\text{Ureia} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Urease}} 2\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^-$	[21]
Acetilcolina	Acetilcolinesterase	H ⁺	$\text{Acetilcolina} \xrightarrow{\text{Acetilcolinesterase}} \text{Acetato} + \text{Colina}$	[22]
Iodeto	HRP (<i>Horseradish Peroxidase</i>)	H ₂ O ₂	$\text{I}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{HRP}} \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{I}^-$	[23]

1.3. Deteção de Etanol

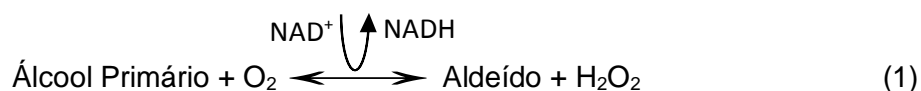
A deteção e quantificação de etanol é um processo muito importante no controlo de qualidade de bebidas alcoólicas, produtos de limpeza, combustíveis, entre outros. Existem inúmeros processos de quantificação de etanol, apesar de estes serem, por norma, muito demorados e dispendiosos. De forma a contornar estes problemas, tem-se assistido a um forte investimento em investigação e desenvolvimento na área dos biossensores descartáveis para a deteção e

quantificação de etanol e que, geralmente se baseiam na imobilização de enzimas sobre o eletrodo de trabalho do sensor [24].

As enzimas mais comuns para este processo são a enzima álcool desidrogenase (ADH) e a enzima álcool oxidase (AOX) que, aliadas a outras espécies químicas tais como azul da Prússia, proteínas hémicas ou nanotubos de carbono, aumentam a especificidade do sensor [24].

1.3.1. Álcool Desidrogenase

Os sensores que são baseados na enzima álcool desidrogenase (AOD) necessitam de NAD^+ como co-fator, tal como apresentado na equação 1.



Os co-fatores são espécies químicas orgânicas ou inorgânicas necessárias para o correto funcionamento da apoenzima, sendo denominados de coenzima no caso de serem orgânicos.

A grande desvantagem da aplicação da AOD em biossensores eletroquímicos está associada à necessidade de proceder à funcionalização do eletrodo de trabalho, não só com a enzima AOD mas também com o seu co-fator, quando existem outras enzimas que têm especificidade para os mesmos compostos e com o co-fator ligado diretamente à própria enzima. Para além disso, a funcionalização do eletrodo de trabalho com este co-fator tem que ocorrer perto da sua superfície e da zona de deposição da enzima, sem criar ligações irreversíveis com a superfície do eletrodo, o que aumenta a dificuldade de obtenção destes sensores, além de aumentar o seu custo de produção [24].

1.3.2. Álcool Oxidase

A enzima álcool oxidase (AOX) acaba, geralmente, por ser preferível à AOD pois o seu co-fator encontra-se acoplado diretamente à enzima, não sendo necessário a funcionalização do eletrodo de trabalho com este co-fator. Tal permite que o custo de produção seja menor do que no caso da enzima AOD, além de que acaba por facilitar a construção do próprio biossensor.

Esta enzima necessita de oxigénio para oxidar o etanol, produzindo acetaldeído e peróxido de hidrogénio, tal como apresentado na equação 2 [24].



Visto esta ser uma reação catalisada por uma enzima, a sua cinética é descrita pela equação de Michaelis-Menten, tal como a enzima álcool desidrogenase que foi apresentada anteriormente na secção 1.3.1. Esta equação descreve a velocidade das reações catalisadas por enzimas e a forma como o valor desta variável depende da concentração do substrato, condições do meio (temperatura, pH...) e na presença de inibidores ou ativadores [25].

A equação de velocidade do modelo de Michaelis-Menten é descrita por,

$$v_0 = \frac{V_M[S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (3)$$

em que V_M é a velocidade máxima, K_M , a constante de Michaelis-Menten e $[S]_0$, a concentração inicial de substrato. Esta equação demonstra que a cinética da reação depende da concentração de substrato e enzima.

1.3.3. Ftalocianina de Cobalto(II)

A ftalocianina de cobalto(II) (CoPC), cuja fórmula de estrutura se encontra representada na Figura 6, foi utilizada por M. Boujtita et al. [24] como mediador redox da reação de oxidação do peróxido de hidrogénio, apresentando uma elevada sensibilidade e seletividade. Esta substância tem uma baixa solubilidade em soluções aquosas, podendo ser utilizada na forma de um pó muito fino, sendo assim ideal para utilizar em elétrodos de carbono impressos (SPCE) [24].

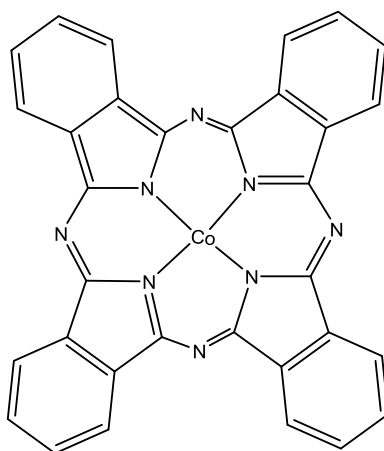
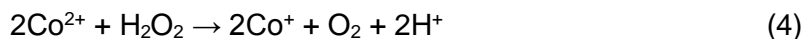


Figura 6 – Fórmula da ftalocianina de cobalto(II).

M. Boujtita et al. [24] misturaram este composto diretamente a uma tinta à base de carbono utilizada para imprimir o eletrodo de trabalho, tornando possível a detecção de peróxido de hidrogénio, através das seguintes reações:



Tal como representado na equação 4 e 5, a ftalocianina de cobalto(II) atua como um electrocatalisador na oxidação de H_2O_2 , que por sua vez reduz o Co^{2+} a Co^+ . A oxidação eletroquímica de Co^+ é a reação que será detetada eletroquimicamente, tal como apresentado na Figura 7.

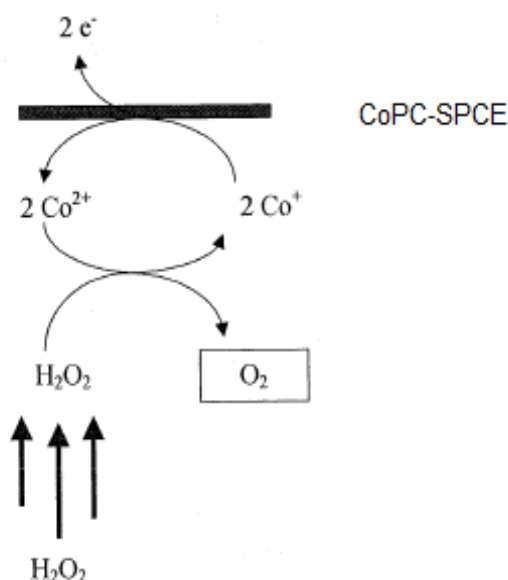


Figura 7 – Esquema adaptado das reações que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho, para detecção e quantificação de peróxido de hidrogénio [24].

Este sistema permite assim a detecção e quantificação do peróxido de hidrogénio existente numa solução de interesse.

1.4. Principais Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e otimização de um sensor eletroquímico que poderia ser utilizado para estudos simples, sem modificação do sensor, e para detecção de peróxido de hidrogénio e etanol, procedendo a modificações na superfície do sensor. Para tal, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- a) implementação da técnica de impressão de sensores;
- b) caracterização e otimização do sensor não modificado;
- c) modificação do sensor com CoPC e respetiva otimização;
- d) modificação do sensor com AOX e respetiva otimização.

No presente trabalho serão apresentados os resultados e discussão de cada um destes passos.

2. Técnicas

2.1. Fabrico de Sensores Eletroquímicos

2.1.1. Técnicas de Impressão

Tal como a designação indica, o fabrico de sensores impressos inclui pelo menos uma técnica de impressão. Na área dos sensores impressos, uma das técnicas de impressão mais utilizadas é a serigrafia (*screen printing*). No entanto, nos últimos anos têm sido utilizadas outras técnicas de impressão para desenvolver diversos sensores impressos, tais como a impressão a jato de tinta, a rotogravura e a flexografia. O recurso a estas tecnologias de impressão permite a produção em massa de sensores de forma simples e rápida, para além de permitir um baixo custo de produção [24, 25].

2.1.1.a. Serigrafia

A serigrafia, ou *screen printing*, é uma técnica muito versátil, permitindo a impressão em substratos planos. É uma técnica económica e que apresenta, durante a impressão, perdas de tinta residuais.

As diferenças mais relevantes desta técnica de impressão relativamente a outras é a possibilidade de imprimir filmes de elevada espessura. A espessura do filme impresso é um parâmetro de fácil ajuste e controlo, que depende essencialmente da tela utilizada durante a impressão, nomeadamente do número de fios por centímetro e do diâmetro do fio utilizada na tela. Na Figura 8 encontra-se um esquema do processo de serigrafia.

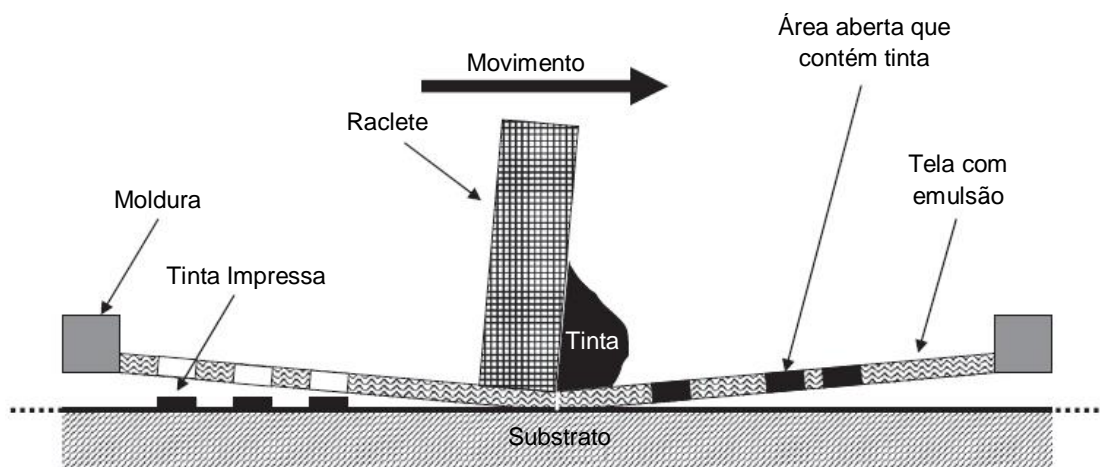


Figura 8 – Ilustração do processo de serigrafia [27].

Neste processo, o padrão do sensor que se quer imprimir encontra-se gravado numa tela, de *nylon* ou poliéster e com moldura de metal ou alumínio, onde é depositada a tinta para a impressão. Durante o processo a raclete espalha a tinta sobre o padrão que se encontra na tela e de seguida exerce uma determinada pressão, permitindo a transferência da tinta para o substrato [27].

A tela utilizada na impressão obedece a duas regras. A largura mínima de linha que pode ser impressa é três vezes o diâmetro do fio da tela e a largura entre os fios da tela deve ter pelo menos três vezes o tamanho de partícula da tinta/pasta utilizada durante a impressão. Para a escolha da tela, para além destas duas regras, devem ser considerados o volume e peso teórico da tinta e a pressão recomendada que pode ser empregue na tela, ou seja, a pressão necessária para que a tela estique o suficiente para a tinta passar de um lado para o outro da tela sem a danificar.

Para além das regras para a escolha da tela, também é importante saber quais as funções da raclete durante a impressão. Esta tem três funções principais: pressionar a tela contra o substrato durante a impressão, ajudar na passagem da tinta através da matriz da tela para o substrato e, por último, remover o excesso de tinta da tela após a impressão. A pressão da raclete sobre a tela é variável e, quando maior for a pressão, mais finos são os filmes impressos, pois a tela encontra-se mais próxima do substrato. Este equipamento deverá ser flexível de forma a moldar-se a qualquer superfície, seja ela lisa ou rugosa, existindo racletes com diferentes graus de flexibilidade.

Para além do tamanho do diâmetro do fio da tela ser importante no controlo da espessura dos filmes impressos, a velocidade da raclete é outro fator fundamental no controlo da espessura. Quando maior for a velocidade da raclete durante a impressão, maior é a espessura do padrão impresso. A razão é muito semelhante à referida para a variação da pressão da raclete, ou seja, se a velocidade da raclete for muito grande, a tela não é tão pressionada sobre o substrato, o que leva a que o padrão impresso tenha uma maior espessura. Esta espessura também é dependente do ângulo da raclete, quando maior for o ângulo da raclete relativamente à tela, menor é a espessura do filme.

Outro fator que também influencia a espessura do filme é o *snap off* da tela, que tem uma relação de proporcionalidade com espessura do filme. O *snap off* é o espaço entre a tela e o substrato, que deve ter tamanho suficiente para que, logo após a passagem raclete, a tela regresse à posição inicial, não ficando demasiado próxima do substrato. Se tal acontecer, a tela pode “colar” no substrato, danificando a impressão e por vezes o próprio quadro.

A técnica de serigrafia pode existir em *flat bed* (impressão usando quadros planos) e em *roll-to-roll* (rolo a rolo), como apresentado na Figura 9. A utilização de serigrafia rolo a rolo permite impressões a velocidades superiores e em maior escala do que a serigrafia *flat bed*, que em geral processa-se “folha a folha”, que é uma vertente da técnica mais utilizada em investigação e desenvolvimento. Esta vertente da técnica permite também a utilização de substratos rígidos, algo que em rolo a rolo não é possível.

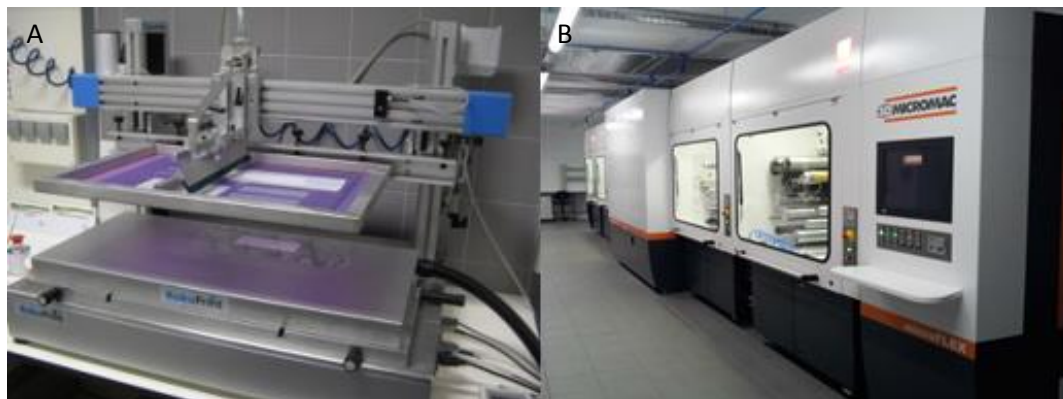


Figura 9 – Fotografias dos aparelhos das técnicas de serigrafia. A – Folha a folha. B – Rolo a rolo.

2.1.1.b. Impressão a Jato de Tinta

Apesar da técnica de jato de tinta ser utilizada há alguns anos no fabrico de sensores, só atualmente se tem tornado mais proeminente nessa área devido ao seu baixo custo e por permitir a deposição de pequenas quantidades de tinta para a impressão. As principais vantagens são a elevada resolução da técnica e ser uma técnica digital (a impressão é feita diretamente a partir do computador) [27].

Esta técnica baseia-se na deposição de pequenas gotas de tinta num substrato, com grande precisão e reprodutibilidade, existindo pelo menos quatro tipos distintos de impressão a jato de tinta: térmica, piezoelétrica, eletrostática e acústica. Os mais utilizados são a impressão a jato de tinta térmica e a impressão a jato de tinta piezoelétrica, que se encontram esquematizadas na Figura 10 [24, 26].

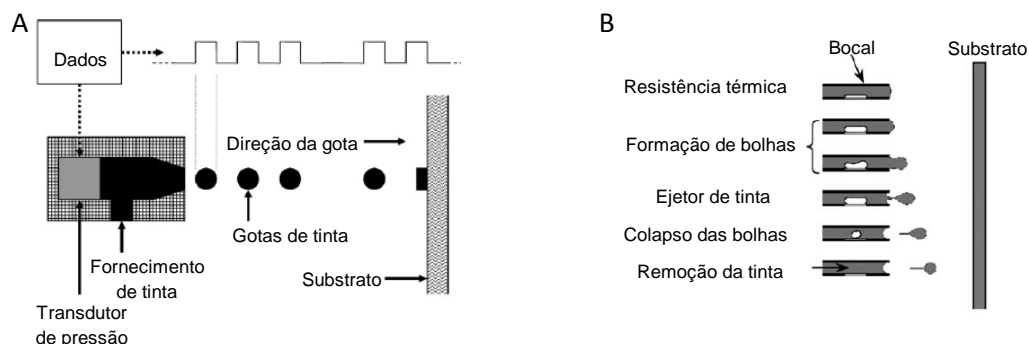


Figura 10 – Ilustração do processo de impressão a jato de tinta. A – Impressão piezoelétrica [27]. B – Impressão térmica [26].

A impressão a jato de tinta térmica é uma técnica mais simples, não requerendo um controle tão preciso da viscosidade da tinta, no entanto, caso sejam utilizados componentes biológicos no sensor, estes poderão desnaturar, o que não acontece com a impressão a jato de tinta piezoelétrica [26]. Isto porque os biossensores contêm como elemento de reconhecimento biológico, por exemplo, enzimas, que poderão desnaturar com o calor, levando a perdas de grande parte, ou mesmo toda, a sua atividade, tornando o sensor inviável.

Existem sensores de glucose impressos pela técnica de jato de tinta, em que se evidenciam a sua reprodutibilidade e baixo custo [8].

2.1.1.c. Rotogravura

Na técnica de rotogravura, o padrão que queremos que seja impresso encontra-se gravado num cilindro de impressão. Ao longo da impressão, esse padrão é preenchido com tinta, seguidamente é retirado o excesso dessa tinta e por fim o rolo é pressionado contra o substrato, imprimindo assim os padrões, tal como esquematizado na Figura 11A [26].

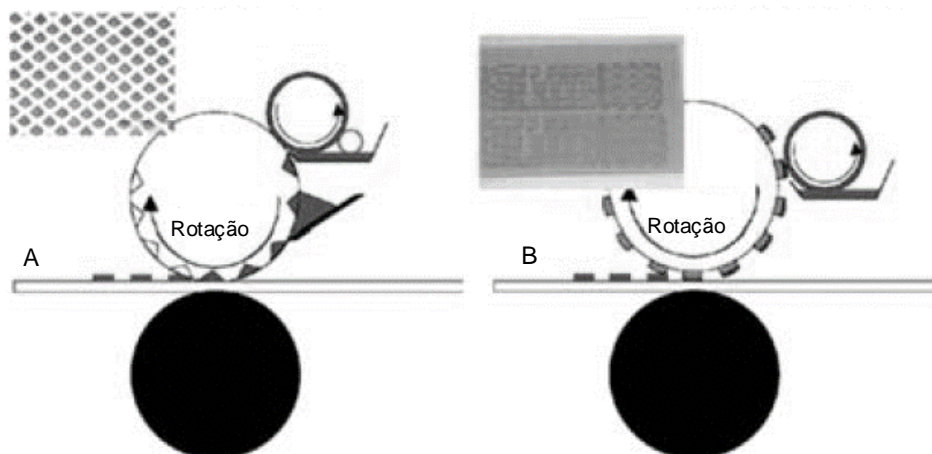


Figura 11 – Ilustração de dois processos de rolo a rolo [26]. A – Gravura. B – Flexografia.

Tipicamente, a rotogravura é uma técnica com grande velocidade de impressão, sendo utilizada para a impressão de filmes metálicos, plásticos e até mesmo notas bancárias [29]. Também é utilizada para a impressão de sensores eletroquímicos de diferentes espécies químicas tais como sulfeto de cádmio [32, 33].

2.1.1.d. Flexografia

Na flexografia o processo de impressão consiste na aplicação de um filme uniforme de tinta sobre o padrão que reveste o rolo de impressão, tal como se encontra representado na Figura 11B. Este rolo, com a tinta, entra em contacto com o substrato, transferindo o padrão do rolo para esse substrato [26].

A flexografia é assim muito similar à rotogravura. As principais diferenças entre as duas técnicas são na pressão exercida, que é maior na flexografia, e na velocidade de impressão, que é menor na flexografia. Por outro lado, a técnica de rotogravura tem um custo associado superior à flexografia mas o tempo de vida do rolo dessa técnica de impressão é tipicamente muito superior [32]. A flexografia é utilizada, por exemplo, na impressão direta de anticorpos em substratos flexíveis [33].

2.1.2. Materiais

Uma das variáveis mais importantes das técnicas de impressão são as tintas escolhidas. A preparação e seleção das tintas dependem da aplicação futura do sensor impresso, podendo ser tintas curáveis por UV, condutoras, eletroluminescentes, entre outras. Todas estas tintas têm que ter elevada viscosidade, o que depende do fabricante e do seu uso específico, sendo importante conhecer a flexibilidade/rigidez do substrato e os tempos de cura recomendáveis da tinta [34].

Os materiais que tipicamente constituem as tintas serigráficas são: resina (também referida como agente ligante), que une as partículas da tinta e permite a sua aderência ao substrato, e solventes, que se encontram dissolvidos na tinta e que são transferidos para a superfície de impressão. Em alguns casos, na constituição da tinta existem também aditivos, que alteram as propriedades físicas da tinta, e pigmentos, responsáveis pela cor da tinta e pela sua opacidade [34]. Na Tabela 2 são apresentadas algumas das principais tintas usadas no fabrico de sensores eletroquímicos e as suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2 – Exemplos de algumas das principais tintas e respetivas vantagens e desvantagens [32–35].

Materiais/ Tintas	Vantagens	Desvantagens
Carbono/ Grafite	Baixo custo; reatividade eletroquímica atrativa; biologicamente inerte.	Possui correntes residuais; baixa condutividade.
Platina	Baixa taxa de formação de fissuras no padrão de impressão após a cura; adequado para fornos de altas temperaturas.	Elevadas temperaturas de cura; elevado custo.
Ouro	Muito inerte, biologicamente compatível.	Elevado custo.
Prata/ Cloreto de Prata	Quimicamente resistente; elevada reversibilidade; elevada densidade de corrente; elevada condutividade; baixas temperaturas de cura.	Baixa durabilidade.
Prata	Boa condutividade.	Oxidação em contacto com soluções aquosas ou o ar.

2.1.3. Substratos

Os eléktodos impressos consistem em filmes depositados sobre um substrato inerte. Os substratos podem dividir-se em duas grandes categorias: (i) substratos flexíveis, tais como materiais poliméricos (como por exemplo PET e PVC) e o papel, e (ii) substratos rígidos como por exemplo vidro e cerâmica [38].

Quando não é necessário que o substrato seja flexível, é preferível que a impressão seja sobre um substrato rígido, por norma o vidro, que tem um menor custo do que a cerâmica e que permite igualmente elevadas temperaturas de cura, tendo uma superfície tanto quimicamente como termicamente estável [38]. Apesar de o vidro ser muito utilizado em detrimento do substrato de cerâmica, este último permite, em geral, obter melhores resultados, maior sensibilidade e seletividade [38]. Caso seja possível, este acaba sempre por ser preferível ao vidro, mas também tem um maior custo associado. Na Tabela 3 encontram-se alguns dos substratos mais utilizados e as suas vantagens e desvantagens.

Tabela 3 – Exemplos de alguns dos principais substratos e respetivas vantagens e desvantagens [36, 37].

Substratos	Vantagens	Desvantagens
Cerâmica	Permite elevadas temperaturas de cura; superfície regular; impermeável a água e oxigénio.	Não é flexível; impossibilidade de utilização nas técnicas rolo a rolo; custo elevado.
Vidro	Permite elevadas temperaturas de cura; transparente; superfície regular; quimicamente e termicamente estável; impermeável a água e oxigénio. Pode ser considerado um substrato flexível se tiver uma espessura <200µm.	Impossibilidade de utilização nas técnicas rolo a rolo. O vidro flexível é difícil de utilizar e extremamente frágil.

Polimérico (PET; PVC)	Transparência; flexibilidade; diferentes gamas de espessura; elevada resistência ao solvente.	Deformação do material devido à cura.
Papel	Cor branca; grande compatibilidade com amostras biológicas; bastante flexível; diferentes gamas de espessura.	Efeito indireto na espessura do filme devido à elevada absorvância do substrato.

Neste trabalho foram utilizados substratos flexíveis, nomeadamente PET, devido ao seu baixo custo e elevada resistência ao solvente e vidro para a realização de testes de caracterização por perfilometria. Como o PET sofre deformação a elevadas temperaturas de cura, este foi sujeito a um pré-tratamento térmico antes de ser utilizado na impressão.

Durante a impressão do sensor sobre o substrato, é necessário ter alguns fatores em conta, tal como as propriedades óticas do material, pois existem diversos sensores transmissivos que necessitam de substratos transparentes e com superfície plana. A rugosidade é outro parâmetro importante da superfície, sendo que o seu valor ideal depende muito do tipo de sensor pretendido. Quando nos referimos a sensores eletroquímicos, um valor elevado da rugosidade é relevante, pois leva a um aumento da área ativa do sensor, aumentando a resposta do mesmo [39]. Por sua vez, as propriedades químicas do substrato estão relacionadas com a sua impermeabilidade, a libertação de eventuais contaminantes e a capacidade de este ser suficientemente inerte a nível químico de modo a não sofrer alterações ao longo de processos químicos, como por exemplo à funcionalização do elétrodo de trabalho com substâncias biológicas [39].

Geralmente, a cura de sensores impressos é térmica, ou seja, é feita a altas temperaturas, sendo por isso importante conhecer as propriedades térmicas e termomecânicas dos substratos. A temperatura a que se utiliza o sensor e a que ocorre a cura deve ser compatível com a temperatura máxima de utilização do substrato, caso contrário é necessário um pré-tratamento do substrato em questão.

2.1.4. *Design*

A técnica de serigrafia permite a impressão de diversos sensores com as mesmas características e com baixo custo de fabrico. Mas antes de imprimir os sensores e até mesmo de escolher o substrato e as tintas a utilizar, é importante ter definido o padrão do sensor que se quer utilizar. Este padrão varia dependendo da utilização do sensor [24, 25].

No caso dos sensores com um sistema de três elétrodos há fatores importantes a ter em conta quando se escolhe o padrão, especialmente a razão entre a área do

elétrodo auxiliar e a do elétrodo de trabalho. É entre o elétrodo de trabalho e o elétrodo auxiliar que existe passagem de corrente elétrica, sendo importante que a área do elétrodo auxiliar seja superior à do elétrodo de trabalho. Tal impede o bloqueio da superfície do elétrodo, a polarização e a eventual passivação resultante da formação de uma camada protetora sobre a superfície do elétrodo, devido à corrente aplicada [38, 39]. Na figura 5A, apresentada anteriormente, é possível observar um sensor com um sistema de três elétrodos. Na Tabela 4 são apresentadas dimensões de diferentes SPEs de algumas marcas comerciais.

Tabela 4 – Dimensões de diferentes biossensores impressos, por marca [4, 41, 42].

Marca	Ø E _T (mm)	Área E _R (mm)	Rácio entre áreas (E _A / E _T)
Bio Logic	2	0,5 x 1	4/1
DropSens	4	— a)	— a)
Gwent	2	— a)	— a)

a) Informação não disponibilizada pelo fabricante.

Nos exemplos que se encontram na Tabela 4 apenas o fornecedor Bio Logic disponibiliza a razão entre a área do elétrodo auxiliar e a área do elétrodo de trabalho, sendo a área do elétrodo auxiliar quatro vezes superior à área do elétrodo de trabalho.

2.1.5. Funcionalização de Elétrodos

Existem diversos métodos de imobilização de substâncias químicas ou biológicas na superfície do elétrodo de trabalho. O objetivo é, no caso das substâncias biológicas, conseguir estabelecer uma ligação entre, por exemplo, a enzima e a superfície do transdutor sem bloquear o centro ativo da enzima ou alterar a sua conformação, o que poderá levar a uma perda da sua atividade biológica. Alguns destes métodos, indicados na Figura 12, foram melhorados ao longo do tempo para minimizar as alterações conformacionais da molécula imobilizada.

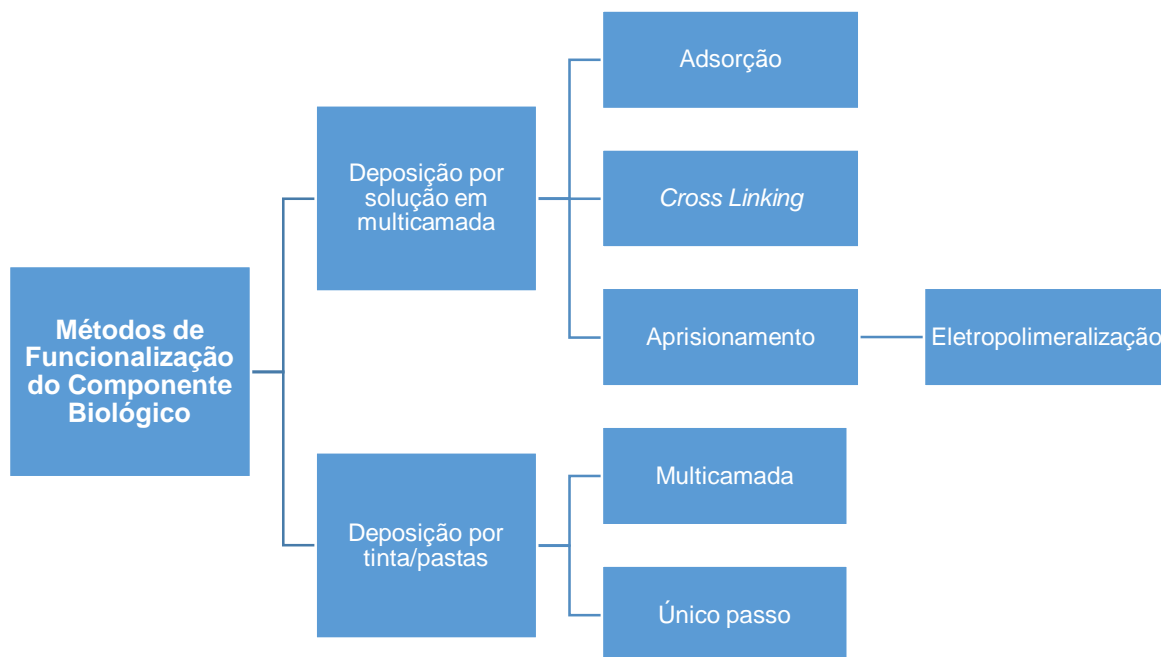


Figura 12 – Métodos de funcionalização de elétrodos impressos biológicos.

No caso da enzima depositada diretamente sobre o sensor, esta deverá ter uma elevada velocidade máxima de reação (V_M), o que ocorre quando as enzimas estão saturadas, e baixos valores da constante de Michaelis-Menten (K_M), que é equivalente à concentração de substrato necessário para atingir metade da velocidade máxima da reação e que indica a afinidade da enzima pelo substrato [2]. Quanto menor for o valor de K_M maior é a afinidade da enzima ao substrato, atingindo-se com maior facilidade metade do valor da velocidade máxima de reação.

O tipo mais comum de deposição, em solução, consiste numa deposição sequencial de camadas de materiais que irão constituir o elétrodo de trabalho. A camada do componente biológico do sensor é depositada sobre uma camada já formada anteriormente quer por adsorção física, eletropolimerização, imobilização por *cross linking* ou aprisionamento, como se pode observar na Figura 13 [43].

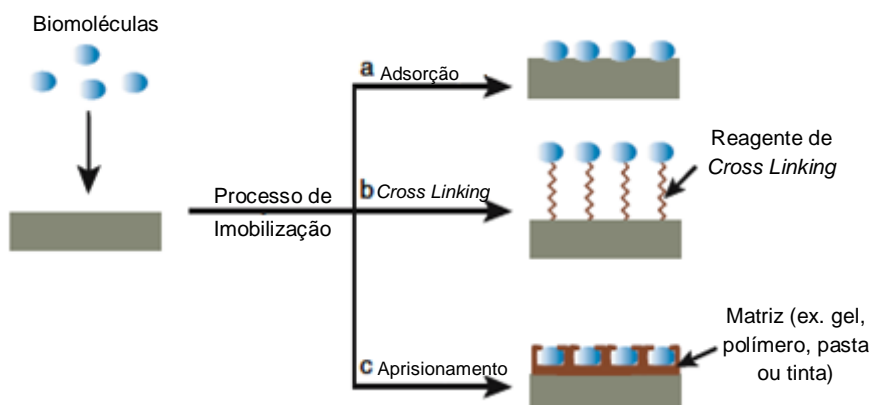


Figura 13 – Métodos de imobilização do elemento de reconhecimento biológico no elétrodo impresso, aquando da preparação de um biossensor [43].

A adsorção é um processo simples e rápido, usado em biossensores descartáveis. A adsorção física é dependente das interações de van der Waals entre as moléculas e o suporte físico, sendo um método muito utilizado devido à sua simplicidade. Além disso, visto não envolver ligações covalentes, a composição nativa da biomolécula é mantida [29, 30].

A imobilização intra/intermolecular por *cross linking*, tal como a técnica de adsorção, é muito utilizada no fabrico de biossensores eletroquímicos, cobrindo a superfície do eléctrodo de trabalho com biomoléculas específicas. Este método é baseado na formação de ligações tridimensionais entre o material biológico e os reagentes bi/multifuncionais. Um dos agentes de *cross linking* mais conhecido e utilizado é o glutaraldeído, um dialdeído saturado. A otimização deste passo de imobilização é muito importante, pois é necessário que exista a preservação da atividade da enzima e das suas características [29, 31].

Esta imobilização pode também ocorrer por aprisionamento do componente biológico numa matriz que posteriormente é depositada sobre o eléctrodo de trabalho, aumentando a estabilidade desse componente de reconhecimento biológico (ex. enzima) [44]. A principal vantagem desta técnica é a compatibilidade com as técnicas de fabrico em massa. Um exemplo de técnica de aprisionamento é a eletropolimerização, em que a biomolécula é depositada de forma homogénea sobre o eléctrodo de trabalho [43]. A grande vantagem das técnicas de aprisionamento de enzimas em filmes poliméricos por eletropolimerização é que este é um processo muito simples, além de que é exequível o controlo da distribuição espacial da enzima imobilizada [43].

A deposição por tintas ou pastas pode ser realizada em multicamada, ou seja, pode existir uma deposição sequencial de diferentes camadas de tinta que irão compor o eléctrodo de trabalho. Esta é uma tecnologia que consiste na impressão com tintas, que contêm enzimas ou outros compostos acoplados, sobre eléctrodos que já tenham sido impressos anteriormente. Este é um tipo de biossensor que pode ser preparado pela impressão, por exemplo, de uma camada de pasta condutora (ex. carbono com grafite), seguida de camadas sucessivas de tintas contendo mediadores, enzimas, estabilizadores, substâncias de *cross linking* ou cofatores [43]. Esta deposição pode também ser realizada num único passo, necessitando de uma mistura de biomoléculas (ex. enzimas) com outros materiais (ex. grafite, catalisadores, estabilizadores, polímeros), formando um compósito biológico (em tinta ou pasta) que é impresso sobre o substrato, produzindo um biossensor num único passo [43]. A técnica de deposição de tintas/pastas num único passo é uma técnica que requer um

processo de otimização mais complexo, devido à necessidade de conservação das propriedades iniciais dos materiais, sendo mais utilizada em produção em massa.

2.2. Caracterização de Sensores Eletroquímicos

2.2.1. Técnicas Eletroquímicas

Muitos dos sensores químicos baseiam-se em métodos eletroanalíticos, devido ao baixo custo, portabilidade e simplicidade. Os métodos eletroanalíticos são métodos instrumentais de análise baseados nas propriedades elétricas de um analito em solução. São técnicas que não necessitam de grandes volumes de amostra e que pouca ou nenhuma preparação têm [2]. Estes métodos dividem-se em dois grupos, os métodos estáticos, em que há ausência de corrente elétrica, e os métodos dinâmicos, em que o valor da corrente elétrica é diferente de zero. Neste trabalho serão contemplados apenas os métodos dinâmicos, dos quais se destacam a voltametria, a cronoamperometria, a coulometria e a eletrogravimetria.

No caso da voltametria cíclica, é utilizado um potencióstato, para aplicar uma determinada diferença de potencial elétrico entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. O equipamento mantém o valor do potencial estável, monitorizando a corrente elétrica que circula através da célula eletroquímica, entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. O valor da corrente elétrica é medido e registado [40].

Na realização de estudos cronoamperométricos é também utilizado um potencióstato.

2.2.1.a. Voltametria Cíclica

Os métodos de varrimento de potencial consistem na aplicação de um potencial ao eletrodo de trabalho. Esse potencial varia continuamente com o tempo, conduzindo à ocorrência de reações de oxidação ou de redução de espécies eletroativas na solução. A variação do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, ao longo do tempo, em voltametria cíclica, pode ser considerado um sinal de excitação com forma triangular, tal como no exemplo esquematizado na Figura 14 [46].

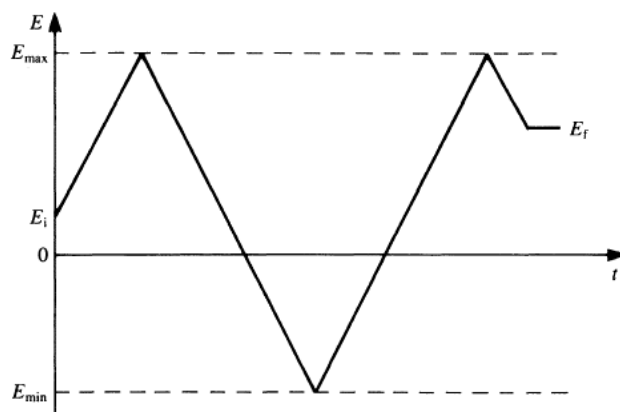


Figura 14 – Sinal de excitação de uma voltametria cíclica [46].

A intensidade de corrente total (i) nestes sistemas tem duas componentes, a corrente faradaica e a corrente capacitiva. A corrente faradaica (i_f) ocorre devido a uma reação de eletrodo, baseando-se na transferência de carga na interface eletrodo – solução de analito, existindo um aumento do valor da corrente faradaica com o aumento da velocidade da reação. A corrente capacitiva (i_c) advém da separação de cargas na dupla camada entre o eletrodo e a solução de analito [5].

Na voltametria existem diversos parâmetros a ter em conta, sendo os mais importantes o sentido do varrimento de potencial, a velocidade desse varrimento e os valores de potencial inicial, mínimo, máximo e final. Na voltametria cíclica, obtém-se um gráfico da intensidade de corrente (i) no eletrodo de trabalho em função do potencial (E) ao longo do tempo, que se designa por voltamograma. Na Figura 15 é representado um exemplo de um voltamograma cíclico para um sistema reversível.

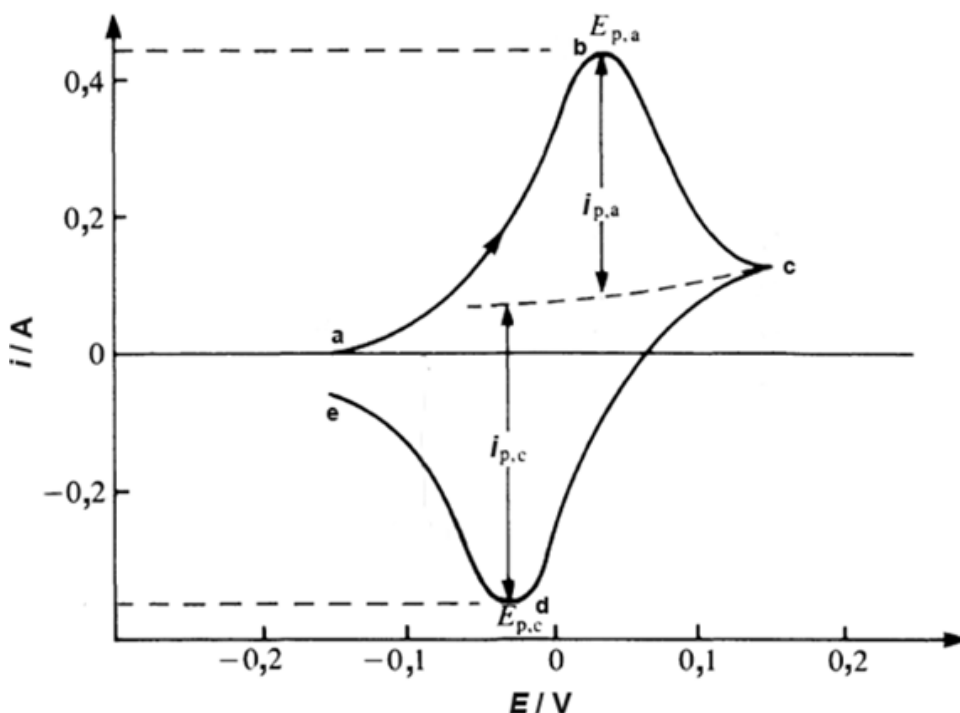


Figura 15 – Voltamograma cíclico típico para um sistema reversível. $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$ representam o potencial do pico anódico e catódico, respetivamente. $i_{p,a}$ e $i_{p,c}$ representam a corrente de pico anódico e catódico, respetivamente.

Na Figura 15 é possível observar a variação da corrente ao longo de um processo de oxidação que ocorre a partir do potencial inicial (a) até um potencial de inversão (c). Nesta região, o potencial está sujeito a um varrimento positivo, ocorrendo a oxidação da espécie estudada. A corrente resultante chama-se corrente de pico anódico ($i_{p,a}$) e o seu potencial é denominado potencial de pico anódico ($E_{p,a}$) [38, 43].

Após o potencial de inversão (c) ser atingido, o varrimento do potencial torna-se negativo. Resulta assim uma corrente catódica ($i_{p,c}$) ocorrendo a redução. O potencial do pico (d) é designado por potencial de pico catódico ($E_{p,c}$) [46]. A inversão de potencial pode ocorrer diversas vezes durante uma única experiência, dependendo do seu número de ciclos.

Nos sistemas reversíveis, o passo mais rápido de todo o processo é a transferência eletrónica entre o elétrodo e a solução, sendo o equilíbrio de espécies expresso pela equação de Nernst,

$$E = E^{\ominus} - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (6)$$

em que E é o potencial do eletrodo de trabalho, E^\ominus é o potencial formal, R é a constante dos gases perfeitos, T é a temperatura, F é a constante de Faraday e Q é o quociente entre as espécies em solução [5].

Para os sistemas reversíveis, os valores de corrente de pico catódico são dados pela equação de Randles-Sevcik, que a 25° C é,

$$i_{p,c} = -2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_O^{1/2} [O]_\infty v^{1/2} \quad (7)$$

em que A é a área do eletrodo (cm^2), D é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), $[O]_\infty$ é a concentração inicial da espécie oxidante ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) e v é a velocidade de varrimento ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$) [5]. A equação para a corrente de pico anódico é idêntica à de pico catódico (equação 7). Esta equação mostra que, teoricamente, $i_p \propto v^{1/2}$.

Numa reação reversível, a quantidade total de espécies oxidadas no pico anódico será idêntico à quantidade de espécies reduzidas no pico catódico. Visto o número total de espécies em solução ser proporcional à corrente de pico, $|i_{p,a}/i_{p,c}| = 1$.

Relativamente às reações reversíveis é possível afirmar que [5]:

- $i_p \propto v^{1/2}$;
- E_p é independente de v ;
- $|E_p - E_{p/2}| = 56,6/n \text{ mV}$;
- $E_{p,a} - E_{p,c} = 59,0/n \text{ mV}$;
- $|i_{p,a}/i_{p,c}| = 1$.

No caso de reações irreversíveis, o voltamograma cíclico obtido é diferente do correspondente a reações reversíveis. Na Figura 16 é representado um exemplo de um voltamograma cíclico para um sistema irreversível.

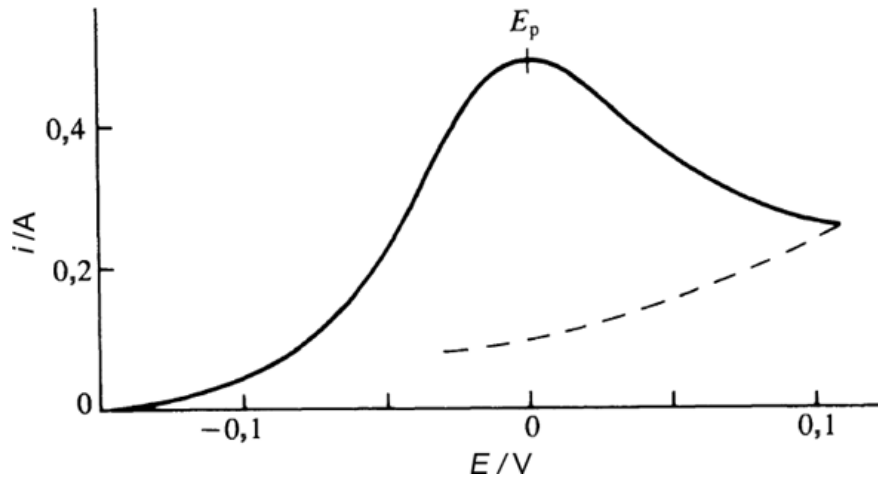


Figura 16 – Voltamograma cíclico típico para um sistema irreversível.

Para uma reação irreversível, o valor da corrente de pico catódico é descrito pela equação [5],

$$i_{p,c} = -2,99 \times 10^5 n(\alpha_c n')^{1/2} A D_O^{1/2} [O]_{\infty} v^{1/2} \quad (8)$$

em que α_c é o coeficiente de transferência de carga catódico e n' é o número de elétrons transferidos no passo limitante da velocidade. A expressão para a corrente de pico catódico (equação 8) é idêntica para a de pico anódico. Em ambos os casos, a equação prevê que $i_p \propto v^{1/2}$. Para verificar se o sistema em estudo é irreversível, é possível utilizar os seguintes testes [5],

- $i_p \propto v^{1/2}$;
- $|E_p - E_{p/2}| = 47,7/\alpha_c n' \text{ mV}$;
- $|(dE_p)/(d \lg(v))| = 29,6/\alpha_c n' \text{ mV}$.

Por fim, existem também sistemas *quasi*-reversíveis, apresentando-se na Figura 17 um voltamograma típico deste tipo de sistemas. É comum que algumas reações de eletrodo, que inicialmente se apresentam como reversíveis a baixas velocidades de varrimento de potencial, passem a ser *quasi*-reversíveis com o aumento da velocidade de varrimento de potencial [5].

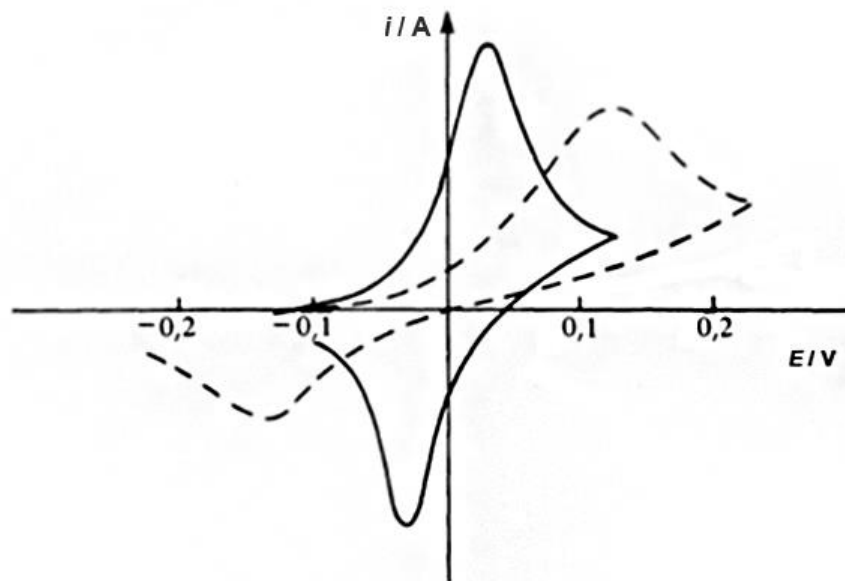


Figura 17 – Efeito do aumento da velocidade de varrimento. — Reação reversível, menores velocidades de varrimento. ---- Reação irreversível, maiores velocidades de varrimento [5].

Para sistemas *quasi*-reversíveis verifica-se que [47],

- $|i_p|$ aumenta com $v^{1/2}$, mas não proporcionalmente;
- $E_{p,c}$ varia inversamente com o aumento de v ;
- ΔE_p é superior a $59/n$ mV, aumentando proporcionalmente com o valor de v ;
- Se $\alpha_c = \alpha_a = 0,5$, $|i_{p,a}/i_{p,c}| = 1$.

2.2.1.b. Cronoamperometria

O estudo da variação da resposta da corrente com o tempo denomina-se cronoamperometria, constituindo um dos métodos eletroanalíticos mais utilizados [5].

A cronoamperometria é muito utilizada no estudo de sensores, devido à sua simplicidade, sendo uma técnica que permite fixar um potencial de interesse característico do analito, minimizando o ruído de fundo que poderá afetar o limite de deteção. Na Figura 18 encontra-se um exemplo de um cronoamperograma, um gráfico da intensidade de corrente ao longo do tempo.

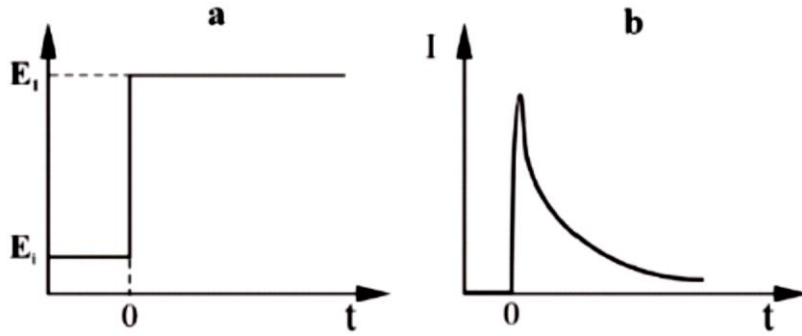


Figura 18 – a – Perfil do potencial aplicado ao longo do tempo. b – Variação da intensidade da corrente ao longo do tempo, cronoamperograma.

Na cronoamperometria a variação de corrente devida a um determinado processo faradaico pode ser descrita através da equação de Cottrell [48],

$$i = \frac{nFAD_0^{\frac{1}{2}} c_0}{\pi^{\frac{1}{2}} t^{\frac{1}{2}}} \quad (9)$$

em que i é intensidade de corrente, n é o número de moles do analito, F é a constante de Faraday, A a área do eléctrodo de trabalho, D o coeficiente de difusão, c a concentração da espécie oxidada e t o tempo. Sabendo o número de moles, pode-se aplicar a equação 9 para determinar o coeficiente de difusão.

2.2.2. Técnicas de Caracterização Elétrica

2.2.2.a. Resistência de folha

A resistência elétrica é a capacidade que um material condutor tem de se opor à corrente elétrica, sendo representada por [49],

$$R = \rho \frac{l}{A_t} \quad (10)$$

em que ρ é a resistividade, uma constante dependente da natureza do material condutor, l o comprimento do material e A_t a área transversal desse mesmo material [49].

Em geral, o método de duas pontas é usado para medir a resistência de um material [50]. A partir desta técnica é possível determinar a resistência de folha (R_s) de uma amostra. A resistência de folha é uma propriedade utilizada em amostras com a mesma espessura ao longo de todo o seu comprimento, sendo muito utilizada na caracterização de filmes. Visto a resistência ser um valor dependente da área

transversal e do comprimento da amostra, é possível determinar a resistência de folha utilizando-se amostras em que a largura é igual ao comprimento, tendo-se [50],

$$R_s = \frac{\rho}{\tau} \quad (11)$$

2.2.2.b. Perfilometria

É possível utilizar a técnica de perfilometria para quantificar a espessura e rugosidade de diversos materiais, sendo utilizado um equipamento chamado perfilômetro, que permite analisar a topografia da superfície de uma amostra sólida. Através da análise da superfície, esta técnica permite determinar o valor da espessura e, obter valores da rugosidade da superfície da amostra e perfis dessa mesma superfície [51].

3. Execução Experimental

Neste capítulo será feita uma breve descrição dos procedimentos experimentais da impressão e caracterização do eletrodo de trabalho impresso e do sistema de três eletrodos impressos antes e após as modificações com CoPC e AOX.

3.1. Solventes e Reagentes

As tintas utilizadas na impressão dos sensores foram obtidas comercialmente e usadas tal como recebidas, com exceção da tinta à base de carbono, que no fabrico de sensores modificados, foi misturada com ftalocianina de cobalto(II), CoPC (Alfa Aesar). Para além da tinta à base de carbono foram usadas tintas comerciais à base de prata e de prata/cloreto de prata.

Para caracterização dos sensores com e sem modificação foi utilizada uma sonda eletroquímica, hexacianoferrato(III) de potássio (Merck, para análise). Em todos os estudos, a sonda eletroquímica foi utilizada numa concentração de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4.

Após a primeira modificação, com CoPC, realizaram-se estudos eletroquímicos com peróxido de hidrogénio (Aldrich, 33%) e tampão fosfato (Panreac, fosfato dipotássio e fosfato monopotássio). Na segunda modificação do eletrodo de trabalho foi usada a enzima álcool oxidase (Sigma, solução aquosa tamponada) solubilizada em 0,1 M PBS pH=7,4, para deteção de etanol (Aga, 99,5%).

3.2. Impressão de sensores

Todo o processo de impressão foi realizado recorrendo-se à técnica de serigrafia, utilizando uma máquina de serigrafia RP 2.2., da Roku Print. Inicialmente, antes de se iniciar a impressão, foi necessário alinhar, manualmente, o quadro que contém os padrões para a impressão do sensor. Em todas as impressões, ajustaram-se os seguintes parâmetros: pressão da raclete no quadro, velocidade da raclete e distância da tela ao substrato durante a impressão (*snap off*).

O quadro utilizado ao longo deste trabalho tinha uma tela de poliéster, tendo uma *mesh* de 68 cm⁻¹ e fios de 55 µm. Durante a impressão a inclinação da raclete em relação à tela foi de 25°, e o *snap off*, ou seja, o espaço entre a tela e o substrato, tinha valores compreendidos entre os 3 - 5 cm.

Usou-se tinta à base de carbono para a impressão do eletrodo de trabalho e do eletrodo auxiliar, tinta à base de prata para os contactos sob os eletrodos e tinta à base de prata/cloreto de prata para o eletrodo de referência.

Entre cada camada, os sensores sofreram uma cura térmica durante 15 minutos a 130 °C. No capítulo 4 será descrito com maior detalhe o processo de fabrico dos sensores.

3.3. Caracterização do Elétrodo de Trabalho

O elétrodo de trabalho foi caracterizado eletricamente, determinando-se a sua resistência de folha, e electroquimicamente, por voltametria cíclica e cronoamperometria. Também se recorreu à técnica de perfilometria para determinar a variação da espessura e rugosidade das amostras.

3.3.1. Caracterização Elétrica pelo Método de Duas Pontas

Foram realizados estudos elétricos para determinação da variação da resistência de folha com a variação do número de camadas de tinta à base de carbono que constituíam o elétrodo de trabalho, pelo método de duas pontas, medindo-se a intensidade de corrente elétrica para as distintas diferenças de potencial aplicadas. Neste estudo foi utilizado um pico amperímetro/fonte de tensão Keithley 6487.

3.3.2. Perfilometria

Foram impressos filmes de carbono, com diferentes espessuras, em lâminas de vidro, cuja superfície plana e rígida facilitou a determinação da espessura e rugosidade dos filmes por perfilometria.

Foi usado um perfilometro Alpha-Step® D-100, de modo a determinar as variações na superfície topográfica dos filmes. O varrimento realizado pela agulha do perfilometro foi desde a superfície lisa (do vidro) até cerca de metade da superfície impressa do elétrodo de trabalho, tendo sido também determinada a rugosidade dos filmes.

3.3.3. Caracterização Eletroquímica

Na caracterização eletroquímica, por voltametria cíclica e cronoamperometria, utilizou-se um potencióstato, modelo Autolab PGSTAT 302N, da Metrohm.

Realizaram-se dois pré-tratamentos eletroquímicos distintos, nos quais foram usadas soluções de 0,1 M tampão fosfato pH=7,4 (PBS) e de 0,2 M ácido sulfúrico (H₂SO₄). No pré-tratamento com PBS aplicou-se uma diferença de potencial de 1,5 V durante 60 s [1]. Quando se utilizou H₂SO₄, procedeu-se a um varrimento de potencial durante dois ciclos completos, com potenciais entre os 0,9-1,5 V e uma velocidade de varrimento de 100 mV.s⁻¹ [52]. Verificou-se que o pré-tratamento com PBS era mais

eficaz, tendo este sido aplicado previamente a todos os sensores impressos salvo indicação em contrário.

Nos estudos eletroquímicos com elétrodos comerciais foi utilizado um elétrodo de carbono vítreo (BASi, 3 mm Ø), um elétrodo de referência Ag/AgCl (Metrohm) e um elétrodo auxiliar de aço 316. A composição dos elétrodos impressos encontra-se descrita na secção 3.2.

Durante o estudo por voltametria cíclica, o intervalo de varrimento nos sensores não modificados foi de -1,0 V a 1,0 V e no caso dos sensores modificados foi tipicamente de -0,2 V a 1,0 V. A velocidade de varrimento foi de 10 mV, exceto indicação em contrário, como por exemplo nos estudos cinéticos.

Durante os estudos cronoamperométricos, em que se utilizou o método da adição padrão, foi aplicado um potencial de 0,3 V ao elétrodo, sendo usada uma solução de 0,1 M PBS pH=7,4. Durante os estudos, com os sensores impressos, da detecção de H_2O_2 , foram adicionadas sucessivas alíquotas de 10 μ L de 4,85 mM de H_2O_2 à solução de PBS. Para a detecção de etanol, e na presença da enzima AOX, foram adicionadas sucessivas alíquotas de 10 μ L de etanol 99,5% (o que equivale a uma concentração de 17 M) à solução de PBS.

3.4. Modificação do Elétrodo de Trabalho com CoPC

Foi adicionada CoPC à tinta à base de carbono, numa proporção de 5% m/m. Esta mistura foi homogeneizada recorrendo a um almofariz, utilizando-se de seguida a tinta para a impressão de sensores.

Utilizou-se tinta à base de carbono modificado com CoPC para a impressão do elétrodo de trabalho, tinta à base de carbono não modificado para a impressão do elétrodo auxiliar, tinta à base de prata para os contactos sob os elétrodos e tinta à base de prata/cloreto de prata para o elétrodo de referência.

3.5. Modificação do Elétrodo de Trabalho com AOX

Foram utilizadas três abordagens distintas para a modificação do elétrodo de trabalho com AOX. Na primeira abordagem apenas se realizou a deposição por gota de uma solução de enzima no elétrodo de trabalho, na segunda abordagem, usou-se uma membrana de nitrocelulose (Merck, 0,45 μ m, 13 mm Ø) sobre a camada de enzima, e na última abordagem foi usada uma solução de ágar-ágar para revestir a camada de enzima. Segue-se uma descrição detalhada de cada abordagem, sendo o procedimento inicial comum.

Após a impressão dos sensores, e respetivo pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4, foi depositada uma gota com 5 μ L de solução de AOX na superfície do eletrodo. Aguardou-se cerca de 4 horas até o solvente da solução de enzima evaporar completamente, observando-se a formação de uma película transparente e brilhante à superfície do eletrodo de trabalho.

No caso da utilização de uma membrana de nitrocelulose (Merck, 0,45 μ m, 13 mm \varnothing), colocou-se a membrana durante algum tempo numa solução de 0,1 M PBS pH=7,4 e seguidamente colocou-se essa membrana sobre o sensor, protegendo toda a superfície do mesmo. Recorreu-se a um filme plástico adesivo, tal como observado na Figura 19, para fixar a membrana sobre a superfície do sensor.



Figura 19 – Fotografia do sensor impresso após ter sido colocada uma membrana de nitrocelulose sobre o sensor e seguidamente um filme plástico adesivo.

Na última abordagem, preparou-se uma solução de ágar-ágar com 0,1 g de ágar-ágar e 10 mL de água, a qual foi aquecida até ao ponto de ebulição, deixando-se a solução em agitação até o ágar-ágar se dissolver totalmente. Seguidamente colocaram-se algumas gotas dessa solução sobre a superfície do eletrodo de trabalho onde anteriormente se havia colocado a solução com AOX, deixando-se gelificar.

4. Impressão de sensores

4.1. Design

Para o sensor impresso foi necessário desenhar três padrões distintos para a tela de serigrafia, recorrendo ao programa CorelDraw X6. Cada padrão corresponde a uma diferente camada e/ou tinta que foi utilizada durante a impressão.

Recorrendo às informações disponibilizadas por fabricantes de sensores eletroquímicos impressos, apresentadas na Tabela 4, e sabendo que o principal parâmetro a considerar é a razão entre a área do elétrodo auxiliar e a do elétrodo de trabalho (secção 2.1.4), foram desenhados diferentes padrões a partir do padrão principal, também este desenhado e representado na Figura 20.

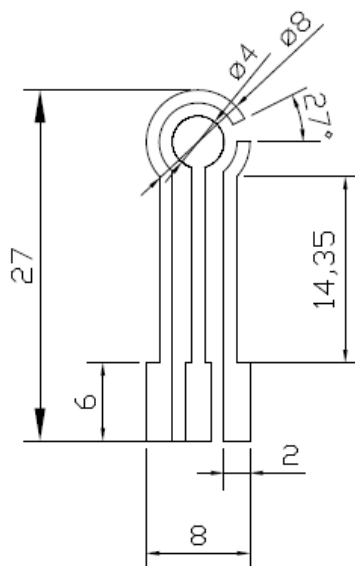


Figura 20 – Desenho técnico do sensor e respetivas medidas em milímetros.

Para cada uma das tintas utilizadas foi criado um padrão diferente. Um dos padrões, que seria impresso por tinta à base de prata, foi utilizado para a impressão de pistas condutoras sob os elétrodos, sendo o responsável pelo aumento da condutividade. Outro dos padrões foi utilizado na impressão do elétrodo de referência, utilizando tinta à base de Ag/AgCl. O último padrão foi utilizado na impressão dos elétrodos de trabalho e auxiliar, recorrendo a tinta à base de carbono. O sensor final teria três padrões, apresentados na Figura 21.

No caso do presente trabalho, a razão da área do elétrodo auxiliar e do elétrodo de trabalho é 1,26:1. Tal como referido no capítulo 2.1.4., o valor da área do elétrodo auxiliar tem que ser superior à do elétrodo de trabalho.



Figura 21 – *Design* dos padrões que compõem o sensor. Prateado – Contactos em que se utiliza tinta à base de prata. Laranja – Eléctrodo de referência em que se utiliza tinta à base de Ag/AgCl. Preto – Eléctrodo de trabalho e auxiliar em que se utiliza tinta à base de carbono.

Estes padrões foram impressos uns sobre os outros, com a posição relativa e ordem esquematizadas na Figura 22.



Figura 22 – *Design* do sensor após a sobreposição dos diferentes padrões, utilizando uma tinta diferente por padrão.

4.2. Constituição dos sensores impressos

Tal como referido anteriormente, foi necessário realizar diferentes impressões, padrão a padrão, para obter o sensor final. Para além disso, dependendo do estudo que se pretendia realizar, a tinta utilizada para os eléctrodos de trabalho e auxiliar foi tinta à base de carbono comercial, sem modificação, ou tinta à base de carbono misturada com o complexo de cobalto utilizado ao longo deste trabalho, CoPC, tal como indicado na Tabela 5.

Tabela 5 – Constituição dos sensores impressos.

	Contactos	Eléctrodo de Trabalho	Eléctrodo Auxiliar	Eléctrodo de Referência
Sensor não Modificado	Prata	Carbono	Carbono	Ag/AgCl
Sensor Modificado	Prata	Carbono modificado com CoPC (5% m/m)	Carbono	Ag/AgCl

Os sensores não modificados foram utilizados essencialmente para a otimização do sensor. Os sensores modificados com CoPC teriam como objetivo a deteção de peróxido de hidrogénio ou, mais tarde, a deteção de etanol, recorrendo-se à enzima AOX.

4.3. Implementação da Técnica

Durante todo o projeto foi utilizada a técnica de serigrafia para impressão dos sensores desenvolvidos e estudados, tendo sido necessário implementar um novo método para melhoramento desse processo, nomeadamente, a nível de alinhamento.

Um dos grandes problemas durante o alinhamento da tela, onde se encontram os padrões dos sensores, é que ao longo do tempo esta acaba por se deformar, levando a que os padrões não estejam sempre na mesma posição, o que dificulta o seu alinhamento. Dessa forma, optou-se por alinhar o quadro de cada vez que se tinha que mudar de padrão e/ou tinta.

Após se proceder ao alinhamento de um dos padrões, era colado à mesa de impressão um molde em PET onde se poderiam encaixar as amostras de substrato, o que permitia que o padrão fosse impresso sempre na mesma posição sobre as diferentes amostras de substrato, tal como apresentado na Figura 23.

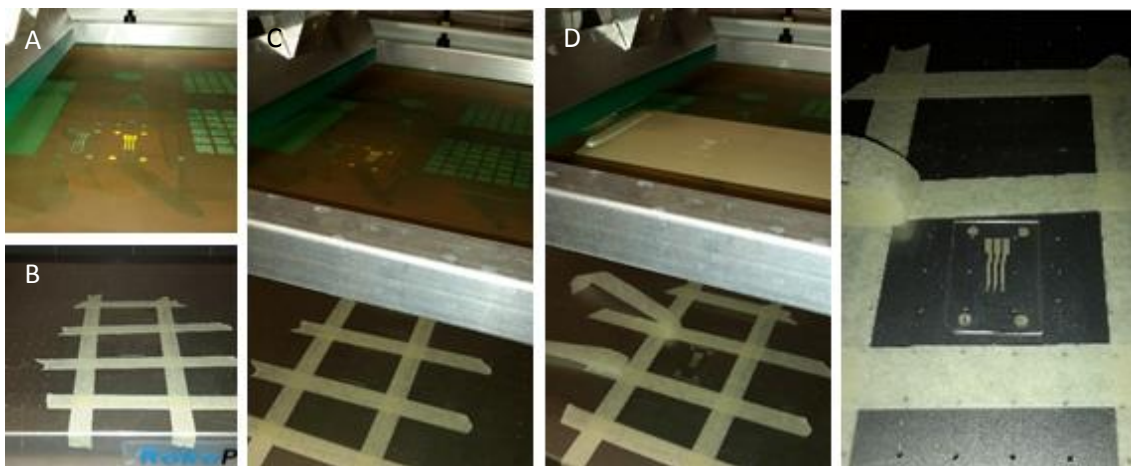


Figura 23 – Processo de alinhamento e impressão dos sensores, pela técnica de serigrafia. A – Padrão escolhido. B – Encaixe das amostras. C – Fotografia antes de impressão. D – Fotografia após impressão. E – Sensor impresso com circuito de prata.

Este método de alinhamento permitiu que se fizessem diversas impressões no mesmo sensor, para aumentar o número de camadas de determinado elétrodo, mantendo um alinhamento satisfatório.

4.4. Alinhamento

Para a impressão dos sensores, e tal como referido anteriormente, foi necessário imprimir diversas camadas, sobrepostas, no mesmo sensor. Tal só foi possível devido à técnica de alinhamento referida em 4.3.

Para avaliar a qualidade do alinhamento aquando da impressão, foi utilizada a técnica de perfilometria, verificando a variação de espessura ao longo da superfície do elétrodo de trabalho. Ao serem sobrepostas quatro camadas de tinta no elétrodo de trabalho, seria de esperar obter um gráfico com quatro patamares distintos, tal como representado na Figura 24. Quanto maior fosse a largura dos patamares, pior seria o alinhamento.



Figura 24 – Perfil representativo de um sensor com quatro camadas distintas de carbono sobrepostas.

Utilizando a técnica de perfilometria nos sensores impressos, foi possível obter o Gráfico 1.

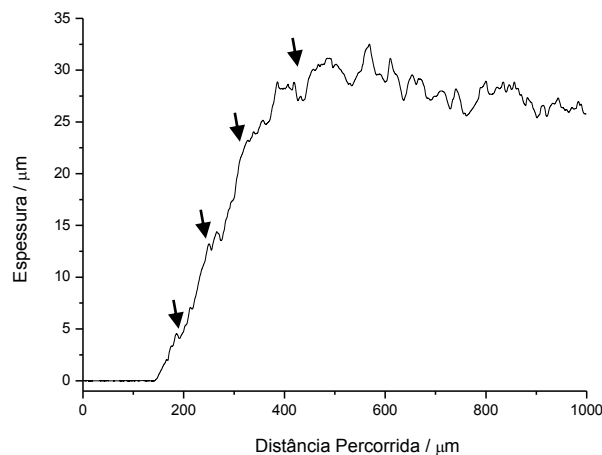


Gráfico 1 – Perfilometria referente ao alinhamento do elétrodo de trabalho com sobreposição de quatro camadas. Os diferentes patamares indicados pelas setas representam as diferentes camadas.

Analisando o perfil deste gráfico é possível observar quatro patamares, cujas larguras são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores da largura dos diferentes patamares representativos das diversas camadas de tinta à base de carbono, representados no Gráfico 1.

Patamar 1	Patamar 2	Patamar 3	Patamar 4
45 μm	65 μm	75 μm	93 μm

Apesar de estes patamares serem visíveis, não são totalmente distintos entre si, sendo quase impercetíveis, o que revela um bom alinhamento.

Foram também realizados testes para determinar a variação da distância entre os elétrodos. Teoricamente, e de acordo com a Figura 20, a distância entre o elétrodo de trabalho e os elétrodos de referência e auxiliar seria de 1 mm mas, recorrendo à técnica de microscopia ótica, foi possível verificar que a distância diminui para cerca de metade, tal como observado na Figura 25.

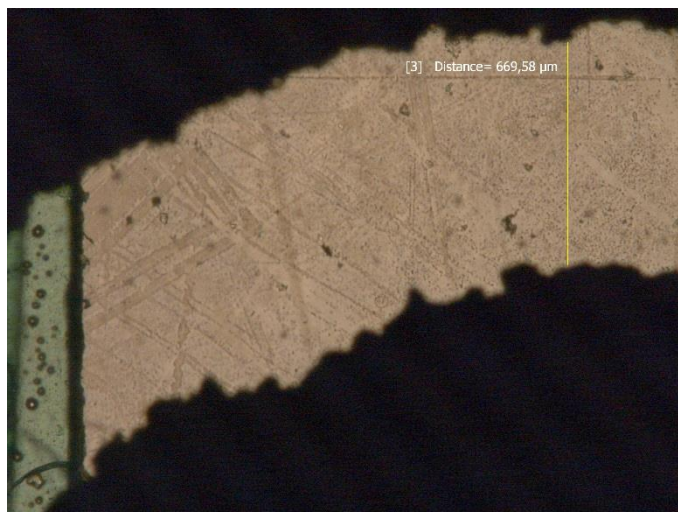


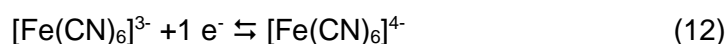
Figura 25 – Medição da distância entre o elétrodo de trabalho e o elétrodo auxiliar, recorrendo à técnica de microscopia ótica.

Uma solução possível para o alinhamento ser ainda mais eficaz seria que o quadro utilizado durante a impressão tivesse uma moldura reforçada, o que poderia impedir a deformação da tela e dos respetivos padrões.

5. Otimização e Caracterização do Elétrodo de Trabalho

5.1. Pré-tratamento

Foi efetuado um estudo inicial com o sensor de três elétrodos impressos e determinou-se que os resultados obtidos estavam muito longe do pretendido. Nesse estudo foi utilizado o hexacianoferrato(III) de potássio, uma sonda aniônica de ferri/ferrocianeto. Esta sonda tem um processo de oxidação-redução *quasi-reversível* representado pela equação,



Este composto é muito utilizado em eletroquímica, sendo empregue como um mediador de eletrões entre espécies ativas, que se encontram dissolvidas numa solução, e o elétrodo de trabalho. O seu processo de redução-oxidação é considerado uma reação de controlo, pois a variação existente nos seus valores de potencial, por variação de parâmetros como o pH e a temperatura, é mínima. Foi realizado um primeiro estudo com a sonda eletroquímica, cujo voltamograma pode ser observado no Gráfico 2.

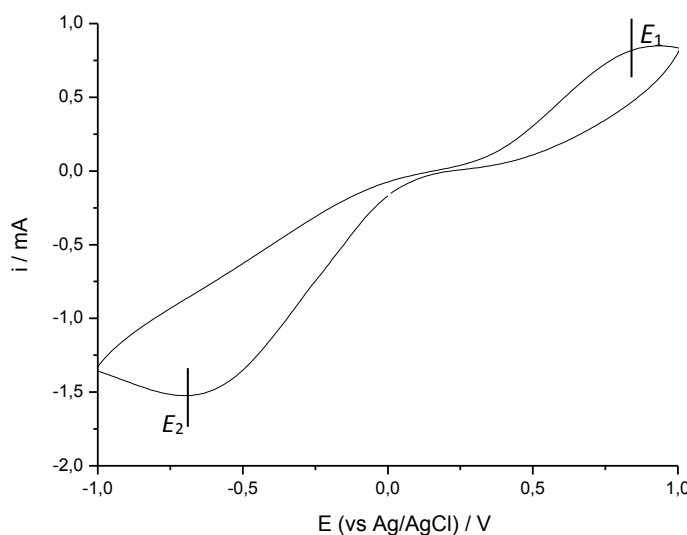


Gráfico 2 – Resultado do teste inicial do sensor de três elétrodos impressos. $E_1 = 0,87 \text{ V}$. $E_2 = -0,70 \text{ V}$. Solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. Velocidade de varrimento = $0,01 \text{ V.s}^{-1}$.

Este voltamograma apresenta uma baixa reversibilidade. Tendo a solução utilizada sido uma sonda eletroquímica com um perfil eletroquímico *quasi-reversível*

muito bem definido, concluiu-se que era necessário proceder a uma otimização do sensor impresso.

Inicialmente fizeram-se testes de pré-tratamento, em que se analisava a resposta do sensor antes e após esse mesmo pré-tratamento. Os dois pré-tratamentos utilizados baseavam-se na utilização de tampão fosfato (PBS) e de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

O pré-tratamento com PBS consistia na aplicação de um determinado potencial elétrico durante cerca de 60-120 s, dependendo do comportamento eletroquímico, durante esse intervalo de tempo. Nos estudos realizados, a diferença de potencial aplicada foi sempre de 1,5 V durante 60 s [1].

Quando se utilizava H_2SO_4 , procedia-se a um tratamento diferente, que consistia num varrimento de potencial durante dois ciclos completos, com potenciais entre os 0,9-1,5 V e com uma velocidade de varrimento de 100 mV.s^{-1} [52]. Ambos os pré-tratamentos tinham como objetivo remover da superfície do sensor substâncias que poderiam ser interferentes, diminuindo o sinal eletroquímico [1] e o aumento da rugosidade da superfície do eléctrodo de trabalho [53].

No Gráfico 3 são apresentados os voltamogramas antes e após o pré-tratamento num dos sensores eletroquímicos, com um eléctrodo de trabalho de apenas uma camada de tinta, à base de carbono.

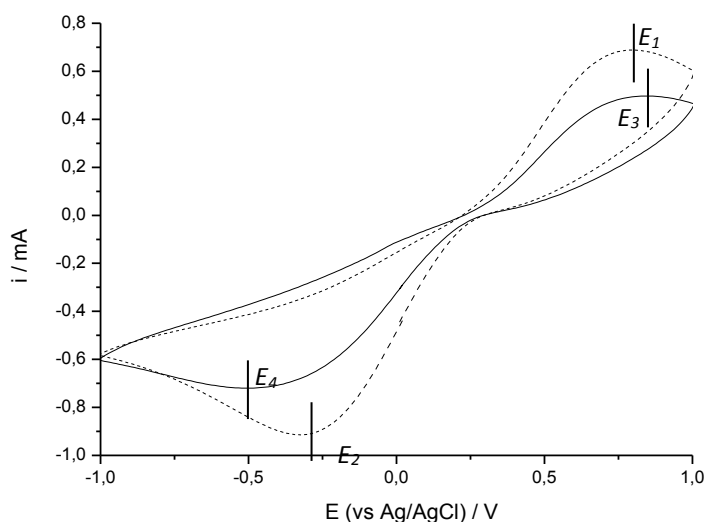


Gráfico 3 – Voltamogramas após pré-tratamento. - - - - Com 0,2 M H_2SO_4 . $E_1 = 0,75 \text{ V}$. $E_2 = -0,28 \text{ V}$. — Com 0,1 M PBS pH 7,4. $E_3 = 0,74 \text{ V}$. $E_4 = -0,42 \text{ V}$. Solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. Velocidade de varrimento = $0,01 \text{ V.s}^{-1}$.

Tal como se pode observar no Gráfico 3, comparativamente ao Gráfico 2, houve melhoramento do sinal eletroquímico após a aplicação de ambos os pré-tratamentos. O pico anódico apresentou valores menos positivos e o pico catódico valores menos negativos.

Apesar de o comportamento eletroquímico melhorar, a variação é mínima. Dessa forma, foi realizado um estudo de caracterização do elétrodo de trabalho a fim de otimizar o seu comportamento eletroquímico. Neste estudo o elétrodo de trabalho tinha sido impresso utilizando tinta à base de carbono, e os restantes elétrodos utilizados eram comerciais e não impressos.

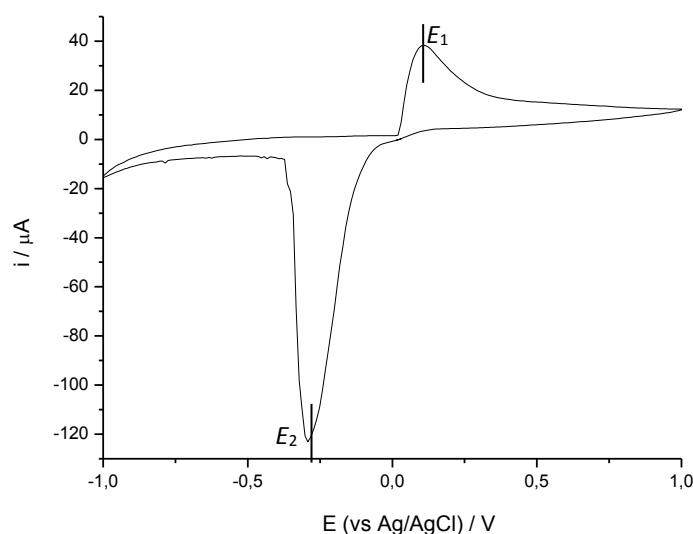
5.2. Revestimento

De forma a otimizar o elétrodo de trabalho, foram realizados testes em que apenas esse elétrodo era impresso, tal como apresentado na Figura 26.



Figura 26 – Elétrodo de trabalho impresso.

Os primeiros testes com este elétrodo foram realizados mergulhando o sistema de três elétrodos – elétrodo de trabalho impresso, elétrodo de referência e auxiliar comerciais – numa solução de sonda eletroquímica, hexacianoferrato(III) de potássio, tendo-se obtido o resultado apresentado no Gráfico 4.



Gráfico 4 – Voltamograma obtido com eléttrodo de carbono impresso sem revestimento, com picos representativos de metais. $E_1 = 0,11$ V. $E_2 = -0,29$ V. Solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. Velocidade de varrimento = $0,01$ V.s⁻¹.

O voltamograma representado no Gráfico 4 apresenta um pico anódico e um pico catódico, ambos t picos de um processo de oxidação-redução de um metal [54], apesar de o sistema de três eléttrodos estar mergulhado numa solução de hexacianoferrato(III) de potássio. Uma das possíveis razões para o aparecimento destes picos seria a oxidação da prata, proveniente da impressão do padrão condutor, devido ao seu contacto com a solução durante a voltametria cíclica.

Posteriormente foram feitos testes com o mesmo eléttrodo mas desta vez com a superfície condutora de prata coberta por um filme plástico adesivo, como apresentado na Figura 27, para impedir o contacto da solução com a superfície de prata. O resultado obtido pode ser verificado no Gráfico 5.



Figura 27 – Eléttrodo de trabalho impresso com revestimento.

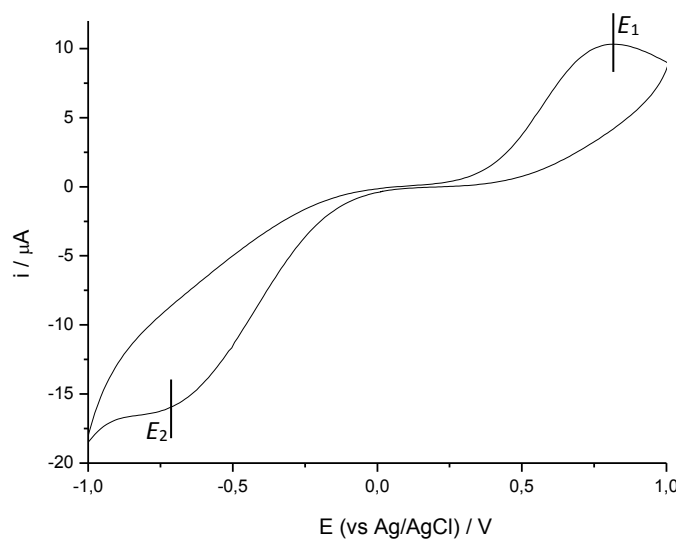


Gráfico 5 - Voltamograma obtido com eletrodo de carbono impresso com revestimento. $E_1 = 0,82$ V. $E_2 = -0,70$ V. Solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. Velocidade de varrimento = $0,01$ V.s⁻¹.

Ao fazer esta alteração deixou-se de observar os picos típicos do processo de oxidação-redução da prata, sendo possível observar os picos referentes ao processo redox da sonda eletroquímica de hexacianoferrato(III) de potássio.

A partir destes resultados foi possível afirmar que, de forma a garantir que a prata não interfira com os ensaios realizados, é necessário a existência de uma camada de revestimento sobre o sensor, para proteger a camada condutora de prata que é impressa sob os eletrodos.

5.3. Variação da Espessura do Eletrodo de Trabalho

Ao analisar os resultados, e sabendo que uma das desvantagens da tinta de carbono é ter uma elevada resistência de folha que, de acordo com a equação 11, é inversamente proporcional à espessura do eletrodo de trabalho do sensor, fizeram-se diversos sensores não apenas com uma, mas com duas, três e quatro camadas de carbono no eletrodo de trabalho. Foram feitos testes de caracterização eletroquímica e elétrica a esses diferentes sensores, a fim de verificar se o sinal eletroquímico melhorava com o aumento do número de camadas. Também foi analisada a espessura e rugosidade da superfície do eletrodo de trabalho, recorrendo à técnica de perfilometria.

5.3.1. Caracterização Eletroquímica

Foram utilizados quatro sensores diferentes, que tinham várias espessuras, ou seja, diferente número de camadas de tinta à base de carbono. Utilizando uma solução de 2,5 mM de sonda eletroquímica a pH=7,4, foram obtidos os resultados apresentados no Gráfico 6.

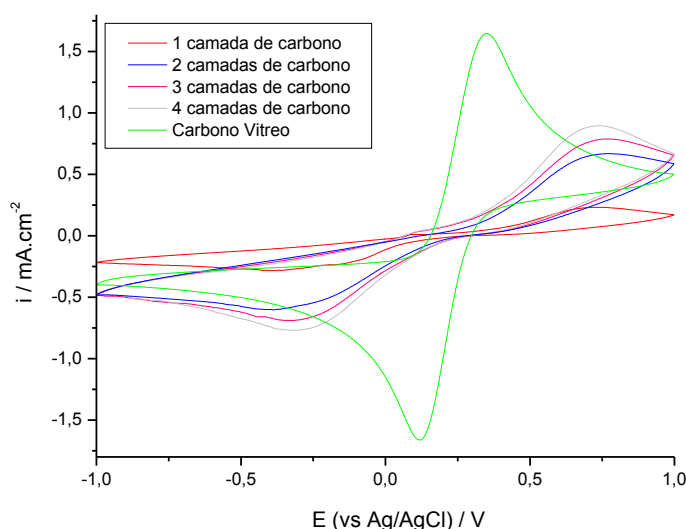


Gráfico 6 – Voltamogramas obtidos com variação do número de camadas, de tinta à base de carbono, do eléttrodo de trabalho impresso e eléttrodo de carbono vítreo comercial. Solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. Velocidade de varrimento = 0,01 V.s⁻¹.

Os testes eletroquímicos permitiram verificar que, à medida que se aumentava o número de camadas, o pico anódico deslocava-se para potenciais menos positivos e o pico catódico para potenciais menos negativos, ou seja, o eléttrodo de trabalho de carbono com uma maior espessura apresenta uma maior reversibilidade eletroquímica do processo redox da sonda à superfície do eléttrodo.

Este resultado permitiu concluir que o comportamento do sistema melhorou com o aumento do número de camadas. Assim sendo, todos os estudos futuros foram feitos com sensores com quatro camadas de tinta à base de carbono. Apesar desta melhoria, os valores de intensidade de corrente obtidos com o sensor de três eléttrodos impressos são inferiores comparativamente aos valores obtidos com o sistema de três eléttrodos não impressos e comerciais, em que o eléttrodo de trabalho é de carbono vítreo.

5.3.2. Caracterização Elétrica

Seguidamente mediu-se a espessura das amostras, utilizando a técnica de perfilometria (secção 3.3.2), tendo-se obtido os resultados apresentados no Gráfico 7.

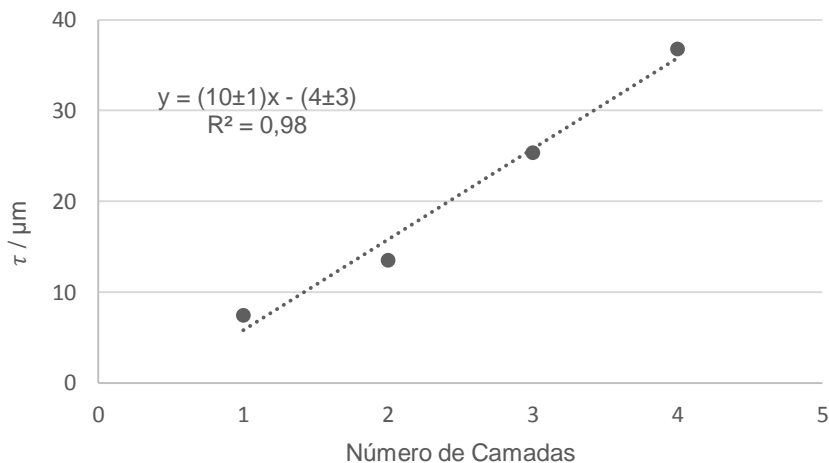


Gráfico 7 – Aumento da espessura do eletrodo de trabalho impresso em função do número de camadas impressas.

Pelo Gráfico 7 foi possível confirmar-se que a espessura do filme aumenta linearmente com o aumento do número de camadas.

De seguida, foi determinada a resistência de folha, utilizando a técnica de duas pontas (secção 3.3.1) e, estabelecida a relação dos seus valores com a variação da espessura das amostras, obtendo-se os resultados apresentados no Gráfico 8.

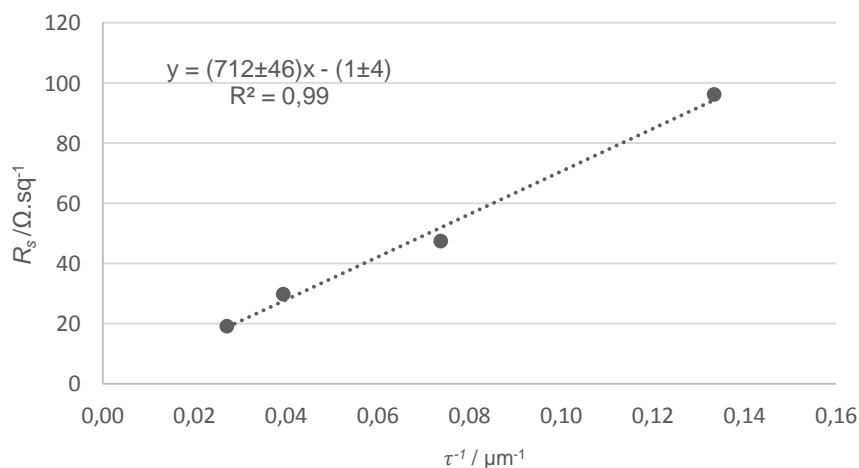


Gráfico 8 – Aumento da resistência de folha do eletrodo de trabalho impresso em função do inverso da espessura.

Como se pode observar no Gráfico 8, verificou-se que a resistência de folha varia linearmente com o inverso da espessura, ou seja, quando maior a espessura do eletrodo de trabalho menor é o valor da resistência de folha.

Ao observar estes resultados, pode-se colocar a hipótese de o melhoramento do sinal eletroquímico, com o aumento da espessura do sensor, estar relacionado com a correspondente diminuição da resistência de folha, de acordo com a equação 11.

Utilizando a técnica de perfilometria, foi também analisada a variação da topografia da superfície do eletrodo, a rugosidade, à medida que se aumentava o número de camadas do eletrodo de trabalho, tendo-se obtido os resultados apresentados no Gráfico 9.

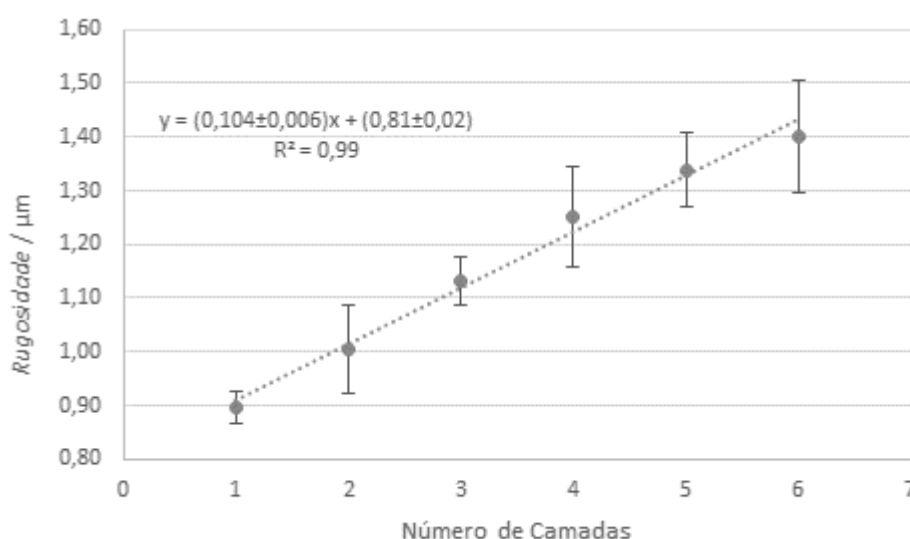


Gráfico 9 – Variação da rugosidade do eletrodo de trabalho impresso em função do número de camadas impressas.

Tal estudo foi realizado porque, quando maior é a rugosidade, maior é a área ativa do sensor, o que no caso dos sensores eletroquímicos poderá ser uma vantagem (secção 2.1.4), querendo-se verificar se o aumento da espessura levava a um aumento ou diminuição da rugosidade, ou se não estaria relacionado com este parâmetro. Pelo Gráfico 9 pode-se afirmar que existe uma relação de linearidade entre o aumento da espessura do eletrodo de trabalho e o aumento da rugosidade.

Após a análise destes resultados, concluiu-se que existem dois parâmetros que poderão ser a causa para a melhoria da resposta eletroquímica do sensor com o aumento da espessura, nomeadamente a diminuição da resistência de folha e o aumento da rugosidade.

5.4. Sistemas de Três Eléttodos Impressos

Após os testes com o eléttrodo de referência e auxiliar comerciais e o eléttrodo de trabalho impresso, foram feitos testes com sistemas de três eléttodos impressos, apresentando-se na Figura 28 um exemplo. Foram estudados diversos sensores com quatro camadas de tinta à base de carbono no eléttrodo de trabalho e auxiliar e apenas uma camada de tinta à base de Ag/AgCl no eléttrodo de referência. Estes sensores foram revestidos por um filme plástico adesivo, de forma a impedir a oxidação da tinta condutora de prata.

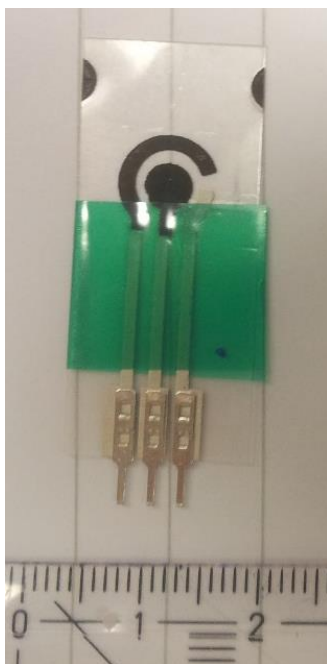


Figura 28 – Sistema de três eléttodos impressos.

5.4.1. Pré-tratamento

Com o objetivo de obter um melhor comportamento eletroquímico, foram feitos testes com sensores impressos que tinham sido submetidos aos pré-tratamentos referidos na secção 5.1, tanto com H_2SO_4 como com PBS. Os resultados encontram-se apresentados no Gráfico 10.

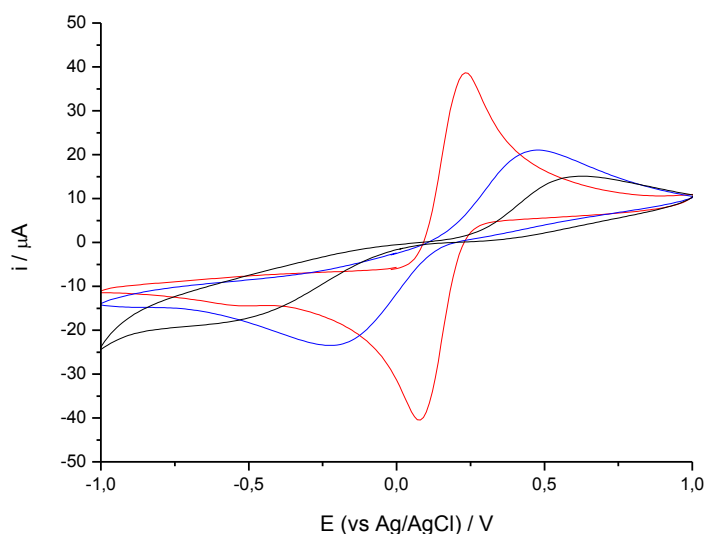


Gráfico 10 – Voltamogramas obtidos com sistema de três eléttrodos impressos antes e após pré-tratamento. Solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. Velocidade de varrimento = 0,01 V.s⁻¹. — Antes do pré-tratamento. — Após pré-tratamento com 0,2 M H₂SO₄. — Após pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4.

Após a análise dos picos anódicos e catódicos apresentados no Gráfico 10, é possível verificar que o sensor sem tipo algum de pré-tratamento é o que tem o pior comportamento eletroquímico. O comportamento eletroquímico do sistema, ao efetuar-se o pré-tratamento com H₂SO₄, melhora, tanto nos valores de potencial, tendo um comportamento mais reversível, como nos valores de corrente, tendo uma maior sensibilidade. Ao efetuar o pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4 o sinal eletroquímico melhora ainda mais. Sendo a reação estudada a mesma para os diferentes sensores (antes e após o pré-tratamento), pode-se concluir que a reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do eléttrodo do sensor aumenta após o sensor ser submetido a um pré-tratamento, especialmente no caso do pré-tratamento com PBS.

Para observar o comportamento dos voltamogramas obtidos pelos sensores desenvolvidos, antes e após os pré-tratamentos com H₂SO₄ e PBS, e compará-los com o voltamograma de um sistema em que o eléttrodo de trabalho é um eléttrodo de carbono vítreo comercial, é apresentado o Gráfico 11 e a Tabela 7.

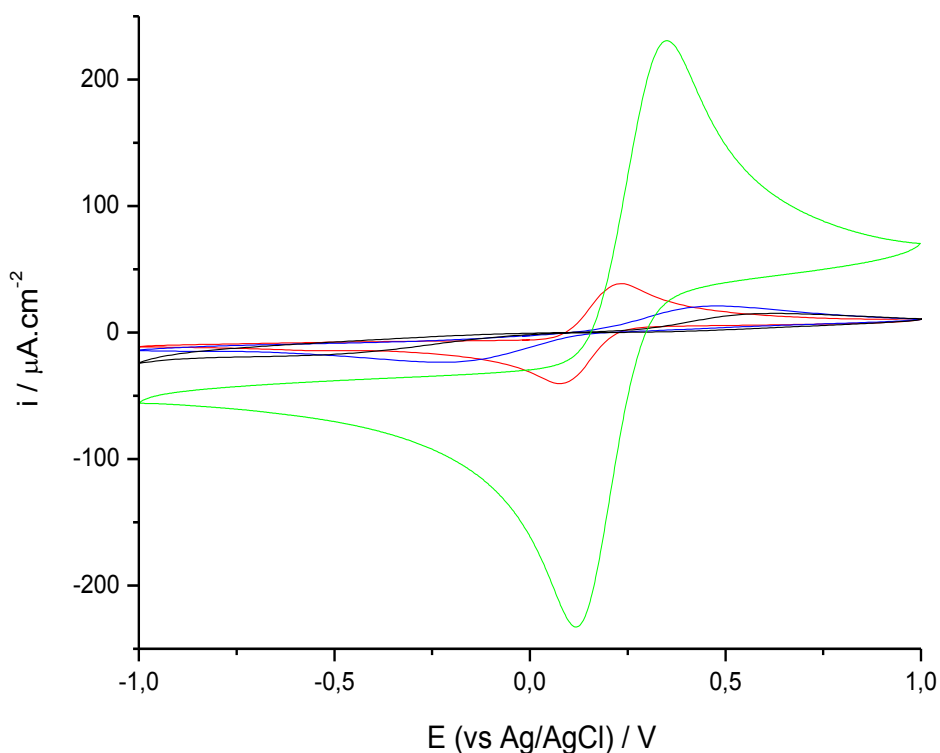


Gráfico 11 – Voltamogramas obtidos com sistema de três elétrodos impressos antes e após pré-tratamento. Solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. Velocidade de varrimento = 0,01 V.s⁻¹. — Antes do pré-tratamento. — Após pré-tratamento com 0,2 M H₂SO₄. — Após pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4. — Carbono vítreo.

Tabela 7 – Valores de corrente obtidos para os picos anódico ($i_{p,a}$) e catódico ($i_{p,c}$) e respetivos valores de potencial, referentes ao Gráfico 11.

	$E_{p,a} / V$	$E_{p,c} / V$	$i_{p,a} / \mu A$	$i_{p,c} / \mu A$
Antes do pré-tratamento	0,63	-0,73	15,06	-19,30
Após pré-tratamento (0,2 M H₂SO₄)	0,49	-0,23	20,47	-23,40
Após pré-tratamento (0,1 M PBS)	0,24	0,08	38,56	-40,37
Carbono Vítreo	0,35	0,12	230,55	-233,48

Pela Tabela 7 é possível verificar que o sistema com um elétrodo de trabalho impresso, após o pré-tratamento com PBS, apresenta um comportamento similar ao sistema com um elétrodo de carbono vítreo comercial, relativamente aos seus valores de potencial, apesar de ter uma menor intensidade de corrente. Tendo-se verificado

que o comportamento eletroquímico após o pré-tratamento com PBS aumentava a reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do elétrodo, foi realizado um estudo mais aprofundado, para confirmação dos resultados obtidos. Este estudo baseou-se na repetibilidade do sistema após o pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4.

Nos sensores impressos é muito importante garantir a repetibilidade da resposta, para que os resultados não variem de sensor para sensor. Foram assim utilizados três sensores diferentes que tinham sido submetidos ao pré-tratamento com PBS, a fim de verificar se os resultados eram repetíveis, tendo-se obtido os voltamogramas apresentados no Gráfico 12 e cujos valores de corrente e de potencial de pico anódico e catódico se encontram na Tabela 8.

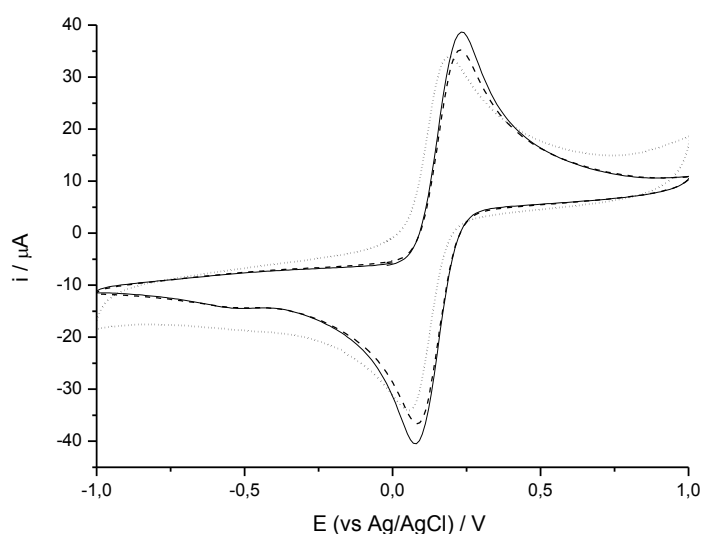


Gráfico 12 - Voltamogramas obtidos com solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 por três sensores diferentes. Velocidade de varrimento = 0,01 V.s⁻¹.

Tabela 8 – Valores de corrente obtidos para os picos anódico ($i_{p,a}$) e catódico ($i_{p,c}$) e respetivos valores de potencial, referentes ao Gráfico 12.

	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3
$E_{p,a} / V$	0,20	0,23	0,24
$E_{p,c} / V$	0,05	0,08	0,08
$\Delta E_p / V$	0,15	0,15	0,16
$i_{p,a} / \mu A$	33,88	35,05	38,56
$i_{p,c} / \mu A$	-34,06	-36,40	-40,37

A partir destes resultados podemos verificar que a média do valor de corrente do pico anódico é $36 \pm 2 \mu\text{A}$ e a do pico catódico é $37 \pm 3 \mu\text{A}$. A média do valor de potencial do pico anódico é $0,22 \pm 0,02 \text{ V}$ e do pico catódico $0,07 \pm 0,02 \text{ V}$, sendo a média do valor da diferença de potencial (ΔE_p) $0,15 \pm 0,01 \text{ V}$.

Recorrendo à Tabela 7 e ao valor médio de ΔE_p obtido após os estudos exploratórios de repetibilidade do sensor impresso, sabe-se que o valor de diferença de potencial do eletrodo comercial de carbono vítreo é 230 mV, sendo o valor médio de ΔE_p do eletrodo à base de carbono impresso de $150 \pm 10 \text{ mV}$. Tal poderá ser indicativo de que reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do eletrodo de trabalho impresso é superior à do eletrodo de trabalho comercial de carbono vítreo. Também é possível comparar o valor obtido com os valores apresentados por Morrin et al. [1]. Este grupo desenvolveu diversos sensores impressos e o melhor valor de ΔE_p obtido foi 264 mV, um valor superior ao obtido para os sensores desenvolvidos ao longo deste trabalho.

Por estes resultados foi possível confirmar que a reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do eletrodo é superior após a aplicação do pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4. Tal como referido anteriormente, estes pré-tratamentos têm como objetivo a remoção, da superfície do sensor, de diversas substâncias que poderiam servir de interferentes e diminuir o sinal eletroquímico [1]. Também poderão levar a um aumento da rugosidade da superfície do eletrodo de trabalho, existindo um aumento da área ativa do eletrodo [53]. Podemos confirmar que estes pré-tratamentos, essencialmente o pré-tratamento com PBS, aumentam a reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do eletrodo de trabalho com quatro camadas de tinta à base de carbono.

Foi ainda feito o estudo microscópico da superfície do sensor, antes e após a modificação com 0,1 M PBS pH=7,4, tendo-se obtido os resultados apresentados na Figura 29.

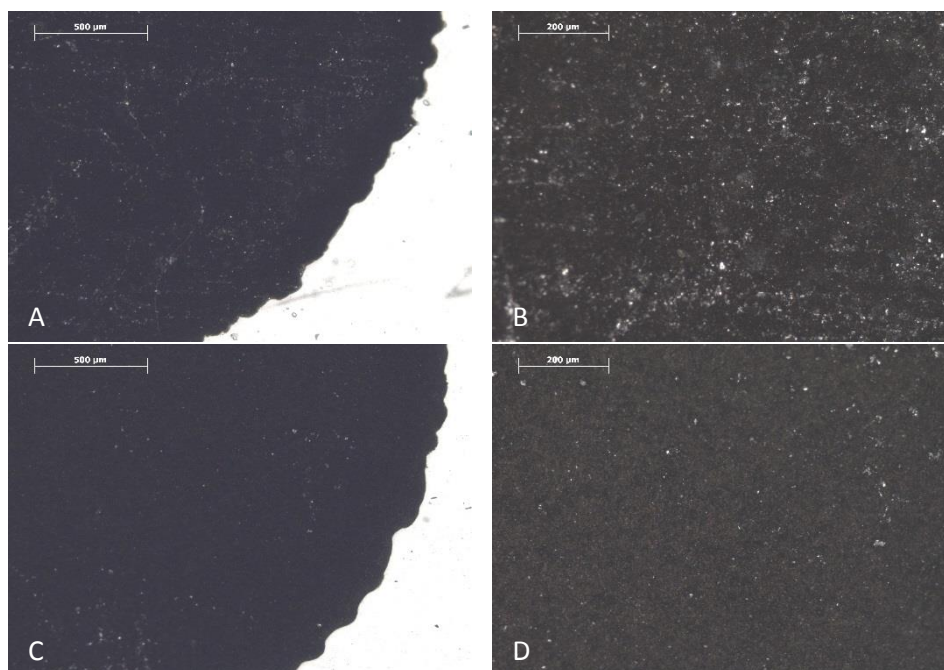


Figura 29 – Imagens obtidas por microscopia ótica do eléttrodo de trabalho do sensor impresso. A e B – Antes do pré-tratamento. C e D – Após pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4.

Foi possível verificar que a superfície do eléttrodo ficara visualmente mais limpa após o pré-tratamento. Por estas imagens podemos afirmar que, na figura A, os pontos brancos que podem ser representativos de impurezas ou irregularidades na superfície do eléttrodo, após o pré-tratamento, desaparecem quase na totalidade. Este desaparecimento poderá levar a uma superfície eletroquímica com menos impurezas que poderiam entrar em contacto com o analito, bloqueando e diminuindo o sinal [1] e a uma maior rugosidade, levando ao aumento da área ativa do eléttrodo de trabalho impresso [53].

5.4.2. Estudo da Estabilidade

Foram feitos testes a fim de verificar quantas vezes é possível utilizar o mesmo sensor sem que o seu sinal eletroquímico se altere. Foram realizados quatro conjuntos de testes, e em cada conjunto realizavam-se um total de 100 varrimentos de potencial seguidos, utilizando como analito de interesse a sonda de hexacianoferrato(III) de potássio. No Gráfico 13 está representado o último voltamograma de cada um desses conjuntos.

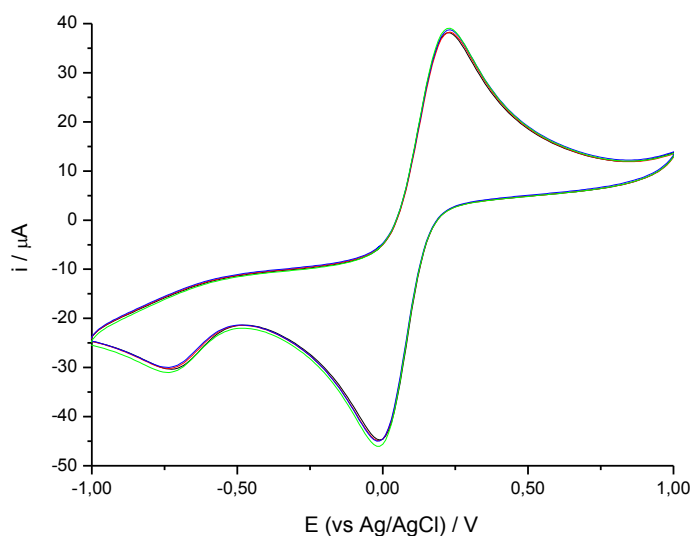


Gráfico 13 – Voltamogramas representativos de cada conjunto de 100 varrimentos, cada cor corresponde a um desses voltamogramas. 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 por três sensores diferentes. Velocidade de varrimento = 0,01 V.s⁻¹.

Por estes testes e através da observação do Gráfico 13, é possível verificar que o sensor não modificado detetou o sinal da sonda pelo menos 400 vezes, não existindo grandes variações nos valores de potencial e de corrente de pico ao longo destes ensaios.

5.4.3. Estudo Cinético

A alteração da velocidade de varrimento provoca alterações nos valores de corrente de pico e nos respetivos valores de potencial, tendo sido realizado um estudo cinético, cujos voltamogramas se observam no Gráfico 14.

Este estudo cinético baseia-se na aplicação de diferentes velocidades de varrimento no mesmo sensor, estando este mergulhado numa solução de hexacianoferrato(III) de potássio. A variação da velocidade de varrimento poderá levar a alterações nos valores de corrente e de potencial, o que poderá indicar se estamos perante uma reação reversível, irreversível ou *quasi*-reversível (secção 2.2.1).

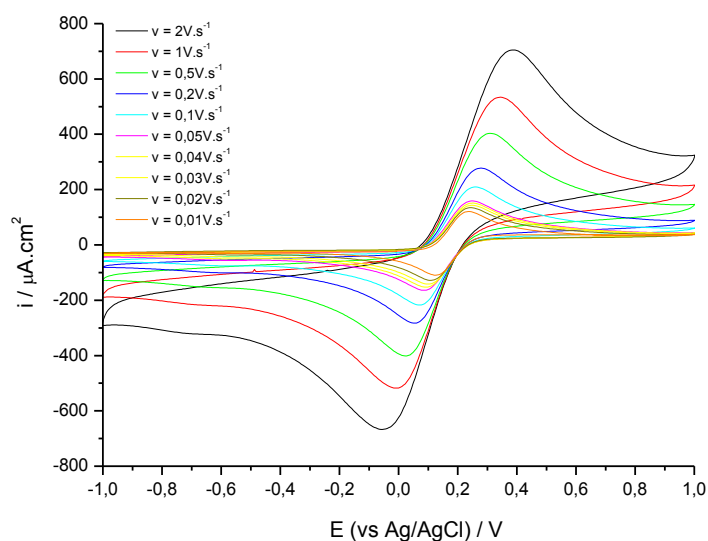


Gráfico 14 – Voltamogramas obtidos no estudo cinético da solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 a diferentes velocidades de varrimento.

Tal como é possível observar no Gráfico 14, um aumento da velocidade de varrimento provoca um aumento do valor da corrente, em valor absoluto, dos picos anódico e catódico e um deslocamento do potencial dos picos anódico e catódico para valores mais positivos e mais negativos, respetivamente.

Representando graficamente a variação dos valores de corrente do pico anódico e catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento, foi possível obter o Gráfico 15.

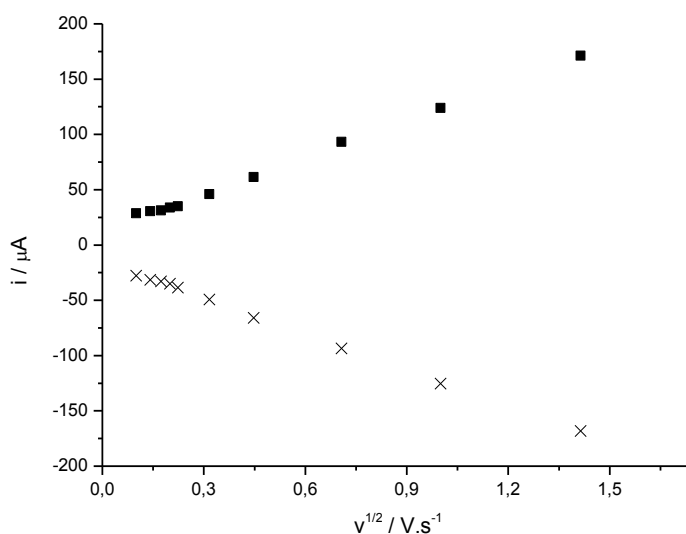


Gráfico 15 – Variação do valor de corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento. Solução 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. ■ Pico anódico. × Pico catódico.

Como se pode observar pelo Gráfico 15, a corrente de pico anódica desloca-se para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varrimento e a corrente de pico catódico desloca-se para valores mais negativos com o aumento da velocidade de varrimento apesar de não ser uma relação proporcional, o que corresponde ao comportamento descrito por uma reação *quasi-reversível* [42], tal como foi referido na secção 2.2.1.a.

Efetuada a representação gráfica dos valores de potencial dos picos anódico e catódico em função da velocidade de varrimento obteve-se o resultado apresentado no Gráfico 16.

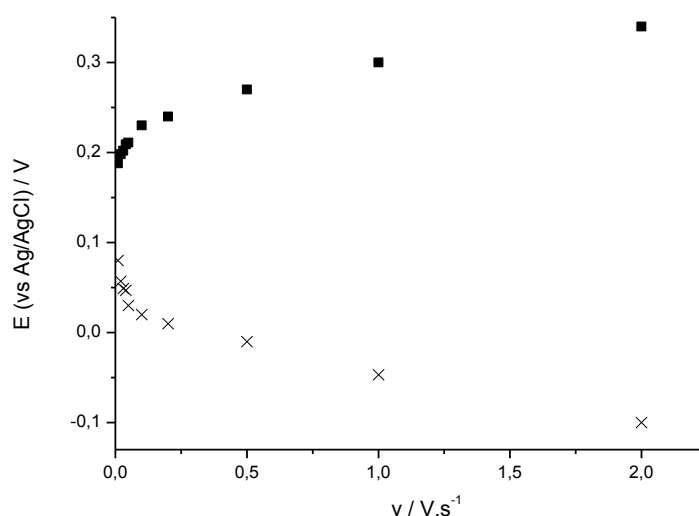


Gráfico 16 – Variação dos valores de potencial dos picos anódico e catódico em função da velocidade de varrimento.

Solução 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. ■ Pico anódico. × Pico catódico.

A partir deste gráfico, podemos observar que a variação do potencial depende da velocidade de varrimento. Verifica-se, a partir do gráfico apresentado, que uma maior velocidade de varrimento leva a uma variação do valor de potencial do pico anódico para valores mais positivos e do pico catódico para valores mais negativos, apresentado um comportamento característico de sistemas *quasi-reversíveis*.

6. Modificação do Elétrodo de Trabalho

6.1. Ftalocianina de Cobalto

A ftalocianina de cobalto(II) é utilizada como mediador redox da reação de oxidação do peróxido de hidrogénio, tendo uma solubilidade mínima em soluções aquosas, tal como referido na secção 1.3.3. Este composto foi utilizado neste trabalho misturando-o diretamente na tinta à base de carbono, sendo utilizado para a deteção de H_2O_2 .

A mistura da tinta à base de carbono com ftalocianina de cobalto(II) foi realizada numa proporção de 5% m/m, ou seja, a cada 0,95 g de tinta à base de carbono foram adicionados 0,05 g de CoPC. No eléctrodo de trabalho modificado, CoPC atua como um eletrocatalisador da oxidação de H_2O_2 , levando à formação de oxigénio e Co(I). O Co(I) é electroquimicamente oxidado, sendo esse o sinal detetado.

Neste estudo foram utilizados sensores com os três eléctrodos impressos. Estes sensores utilizavam quatro camadas de tinta à base de carbono, modificada com CoPC, no eléctrodo de trabalho e uma camada de um filme plástico adesivo que revestia os contactos do sensor, para proteger a prata e impedir a sua oxidação.

6.1.1. Pré-tratamento

O sistema eletroquímico constituído por um eléctrodo de trabalho não modificado, tal como já foi referido, apresentou uma maior reversibilidade ao ser submetido a um pré-tratamento em que era utilizado 0,1 M PBS pH=7,4, aplicando um potencial de 1,5 V durante 60s. No sensor modificado existia o risco de o pré-tratamento interferir com CoPC que constituía a superfície do eléctrodo de trabalho, impedindo a deteção do etanol. Dessa forma era necessário analisar se tal ocorreria ou não.

Inicialmente procedeu-se ao pré-tratamento do sensor modificado, tal como se pode observar no Gráfico 17.

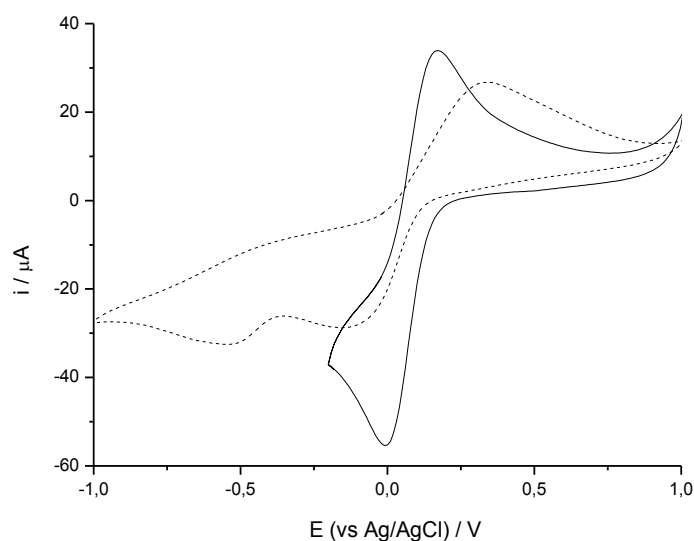


Gráfico 17 – Voltamogramas obtidos em solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. Velocidade de varrimento = $0,01 \text{ V.s}^{-1}$. - - - Sistema de três elétródos impressos antes de ser submetido ao pré-tratamento — Sistema de três elétródos impressos após pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4.

Para facilitar a comparação entre os diferentes voltamogramas, os valores de corrente e potencial dos picos anódico e catódico, foram sintetizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de corrente obtidos para os picos anódico ($i_{p,a}$) e catódico ($i_{p,c}$) e respectivos valores de potencial, referentes ao Gráfico 17.

	$E_{p,a} / \text{V}$	$E_{p,c} / \text{V}$	$i_{p,a} / \mu\text{A}$	$i_{p,c} / \mu\text{A}$
Antes do pré-tratamento	0,34	-0,15	26,65	-28,76
Após pré-tratamento (0,1 M PBS)	0,17	-0,01	33,91	-55,37
Carbono Vítreo	0,35	0,12	230,6	-233,5

Tendo sido verificado um aumento da reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do eléttrodo de trabalho modificado após o pré-tratamento, tal como no sensor não modificado, foram feitos estudos exploratórios de repetibilidade com os sensores modificados. Neste estudo utilizou-se uma sonda eletroquímica de hexacianoferrato(III) de potássio e recorreu-se a três sensores diferentes, a fim de verificar se após a modificação da tinta, com CoPC e respetivo pré-tratamento, existiriam variações nos valores de corrente e potencial dos picos anódico e catódico dos diferentes sensores. Os resultados encontram-se apresentados no Gráfico 18.

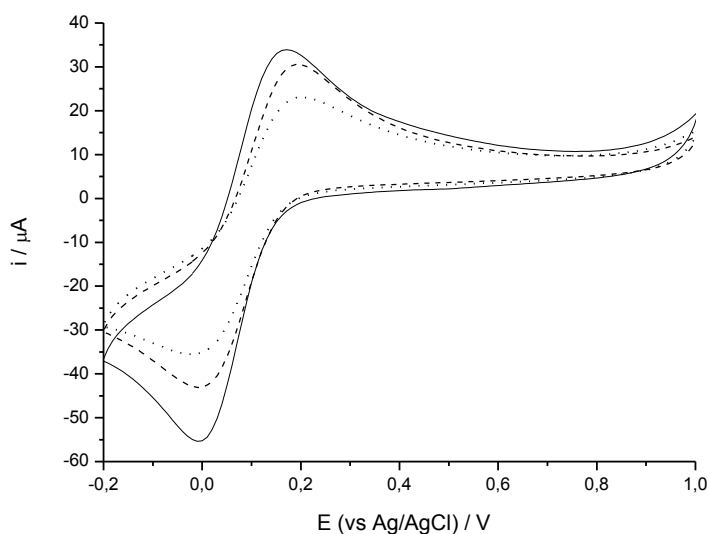


Gráfico 18 – Voltamogramas obtidos em solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 por três sensores diferentes. Velocidade de varrimento = 0,01 V.s⁻¹.

Analisando o Gráfico 18, é possível verificar uma variação dos valores de corrente dos picos anódico e catódico, embora os respetivos valores de potencial sejam idênticos para os três sensores. Na Tabela 10 são apresentados os valores referentes aos voltamogramas obtidos.

Tabela 10 – Valores de corrente obtidos para os picos anódico ($i_{p,a}$) e catódico ($i_{p,c}$) e respetivos valores de potencial, referentes ao Gráfico 18.

	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3
$E_{p,a} / V$	0,17	0,20	0,20
$E_{p,c} / V$	-0,01	-0,01	-0,02
$\Delta E_p / V$	0,18	0,21	0,22
$i_{p,a} / \mu A$	33,91	30,61	23,17
$i_{p,c} / \mu A$	-55,37	-43,00	-35,60

A partir destes resultados podemos afirmar que a média do valor de corrente do pico anódico é $29 \pm 6 \mu A$ e a do pico catódico, em valor absoluto, $45 \pm 10 \mu A$. Os valores comprovam que o sensor modificado não tem uma repetibilidade tão elevada comparativamente aos sensores não modificados, o que provavelmente está relacionado com o facto de a mistura de CoPC não ser totalmente uniforme. Provavelmente existe uma menor quantidade de CoPC, para ser oxidada eletroquimicamente, em alguns sensores comparativamente com outros. Se existirem menos CoPC a intensidade do sinal poderá ser menor. Este problema poderia ser

ultrapassado estudando-se novos métodos de mistura de ambos os compostos, como por exemplo misturar a ftalocianina de cobalto(II) durante a formulação da própria tinta e não à tinta comercial, já totalmente formulada.

As médias dos valores de potencial dos picos anódico e catódico são, respetivamente, $0,19 \pm 0,02$ V e $-0,013 \pm 0,006$ V. Apesar de grandes variações no valor médio de corrente dos picos, os valores de potencial dos picos são semelhantes, sendo a média de ΔE_p de $0,20 \pm 0,02$ V.

Sabendo que para os sensores sem modificação a ΔE_p do processo redox da sonda é de 150 ± 10 mV e que para o sensor modificado este valor é de 203 ± 20 mV, podemos afirmar que os sistemas com estes elétrodos de trabalho, modificado e não modificado, têm um comportamento semelhante, apresentando uma maior reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do respetivo elétrodo do que o elétrodo de trabalho comercial, que tem um valor de ΔE_p de 230 mV.

Tal como nos resultados apresentados na secção 5.4.1 para o sensor não modificado, o elétrodo de trabalho modificado também apresenta uma maior reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do elétrodo após a aplicação do pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4, podendo existir a remoção, da superfície do sensor, de diversas substâncias que poderiam ser interferentes e diminuir o sinal eletroquímico [1], e um possível aumento da rugosidade da superfície [53]. Este pré-tratamento aumentou a reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do elétrodo de trabalho impresso com tinta à base de carbono, modificada com CoPC, no elétrodo de trabalho.

Foi também feito um estudo da superfície do elétrodo por microscopia ótica, cujas imagens se encontram na Figura 30.

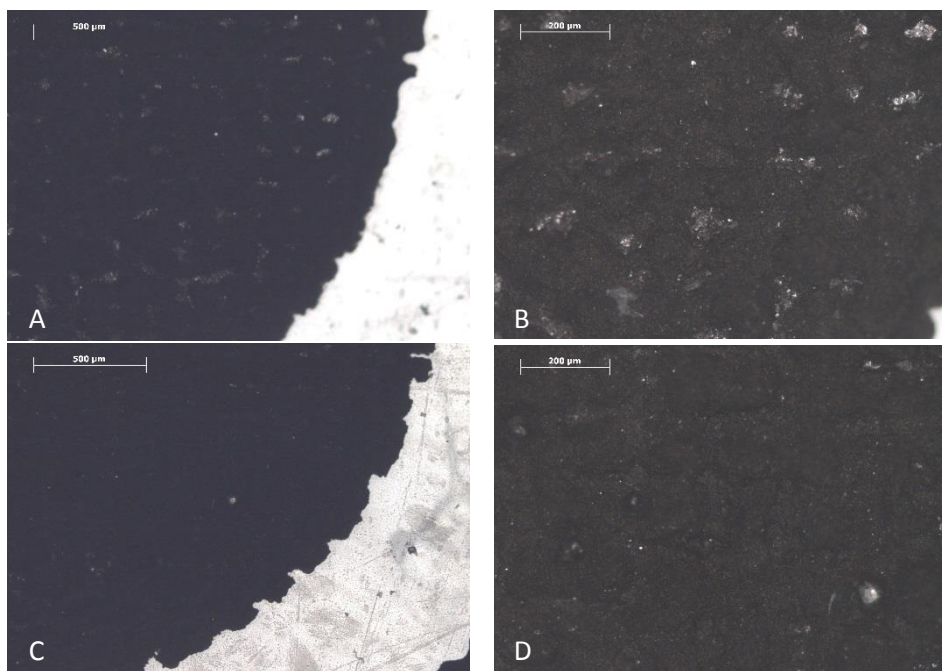


Figura 30 – Imagens obtidas por microscopia ótica do elétrodo de trabalho do sensor impresso. A e B – Antes do pré-tratamento. C e D – Após pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4.

Por este estudo é possível afirmar, tal como as imagens de microscopia ótica do sensor não modificado, que após o pré-tratamento com 0,1 M PBS pH=7,4, a superfície deste sensor aparenta uma maior uniformidade, o que possivelmente é um indicativo da diminuição do número de impurezas à superfície do sensor [1].

Tal como no sensor não modificado, provavelmente os pontos brancos representam as impurezas, que desaparecem quase na totalidade nas figuras 29C e 29D. Na Figura 30, as prováveis impurezas encontram-se visualmente mais condensadas e em menor quantidade comparativamente com a Figura 29 (secção 5.4.1, imagens microscópicas da superfície do elétrodo de trabalho não modificado). Apesar dessas impurezas existirem em menor quantidade na Figura 30, comparativamente com as impurezas das imagens microscópicas da Figura 29, existem com um maior diâmetro, o que poderá ser devido ao processo de mistura da tinta. Para misturar a ftalocianina de cobalto(II) com a tinta utilizou-se um almofariz, que possivelmente levara a uma coesão das impurezas existentes. Outra hipótese é não estarmos perante apenas impurezas, mas o que estamos a observar serem partículas de CoPC.

6.1.2. Estudo da Estabilidade

Tal como no sensor não modificado, foram feitos estudos de estabilidade em que se aferiu quantos ensaios seria possível realizar com o mesmo sensor, se não houvesse alterações na superfície dos elétrodos durante esse ensaio (como por

exemplo a formação de novas camadas sobre a superfície do eletrodo). Tal como na secção 5.4.2, foram realizados quatro conjuntos de testes. Em cada um desses testes tinham-se obtido 100 voltamogramas e os últimos voltamogramas de cada um desses conjuntos foram comparados entre si, tal como se observa no Gráfico 19.

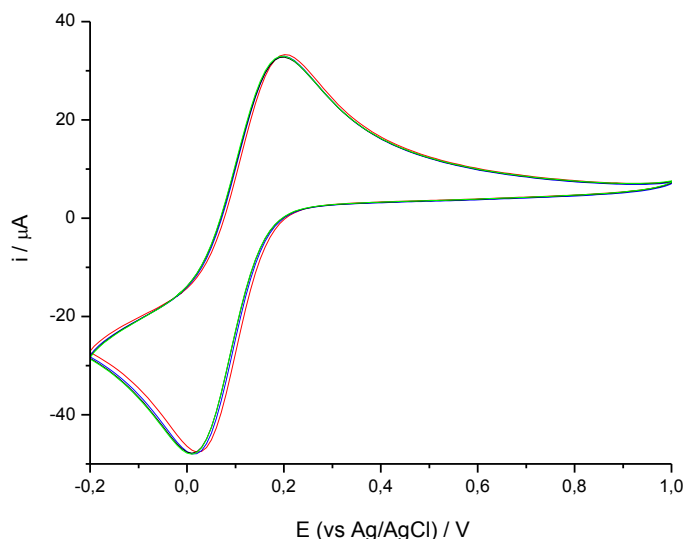


Gráfico 19 – Voltamogramas representativos de cada conjunto de 100 varrimentos, cada cor corresponde a um desses voltamogramas. 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 por três sensores diferentes.

Velocidade de varrimento = 0,01 V.s⁻¹.

Este teste, consistiu em quatro conjuntos de ensaios, feitos no mesmo dia e, observando o Gráfico 19, pode-se afirmar que o sensor modificado detetou o sinal da sonda pelo menos 400 vezes, não existindo variações significativas nos valores de potencial e de corrente ao longo destes ensaios.

Por fim, para verificar a estabilidade deste tipo de sensores, foram feitos testes com o mesmo sensor, modificado com CoPC, ao longo de um mês. Inicialmente este sensor foi sujeito ao pré-tratamento com PBS e foi feito de imediato o seu voltamograma, após o tratamento. De seguida foram feitos mais três voltamogramas, com uma semana de intervalo entre cada leitura, estando os resultados obtidos representados no Gráfico 20.

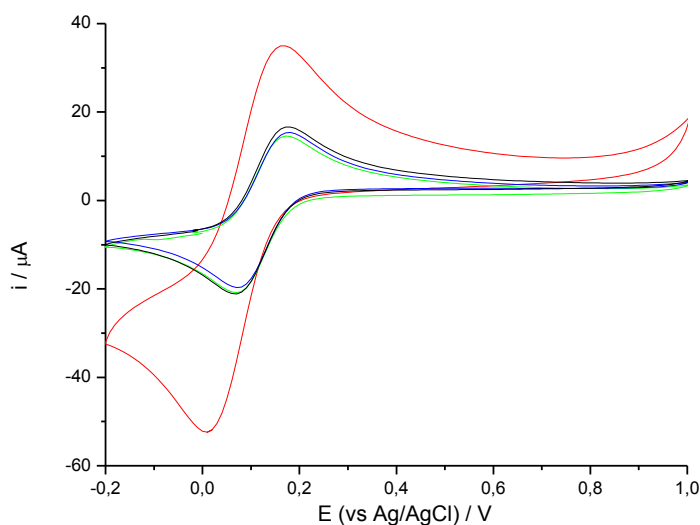


Gráfico 20 – Voltamogramas obtidos com intervalo de uma semana utilizando o mesmo sensor, que fora submetido a um pré-tratamento apenas uma vez. Solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. Velocidade de varrimento = 0,01 V.s⁻¹. — Primeira Semana. — Segunda Semana. — Terceira Semana. — Quarta Semana.

Pela observação do Gráfico 20, é possível concluir que, ao longo das quatro semanas, apesar de os valores de potencial anódico e catódico não variarem muito, o mesmo não acontece com a intensidade de corrente. No primeiro ensaio, comparativamente com os restantes, é visível uma maior intensidade de corrente que diminui para cerca de metade do seu valor inicial nas semanas seguintes. Apesar desta diminuição da primeira para a segunda semana, ao longo das restantes semanas de estudo, o valor de corrente aparenta estabilizar. Tal poderá estar relacionado com a limpeza do eléctrodo. No primeiro ensaio o eléctrodo tinha acabado de ser “limpo” ao recorrer ao pré-tratamento. O mesmo não havia acontecido durante as restantes semanas, em que apenas se colocava o eléctrodo em solução, sem pré-tratamento algum feito no momento, de forma a verificar se o primeiro pré-tratamento, feito previamente à primeira utilização do sensor, seria estável ao longo de um elevado período de tempo.

6.1.3. Estudo Cinético

Para os sensores modificados com CoPC foi também realizado um estudo cinético, tal como na secção 5.4.3, cujos voltamogramas se observam no Gráfico 21.

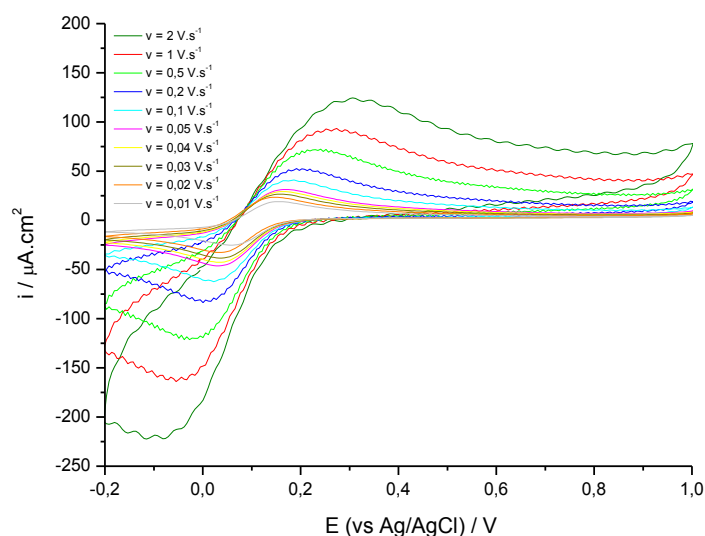


Gráfico 21 – Voltamogramas obtidos no estudo cinético da solução de 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4 a diferentes velocidades de varrimento.

Ao analisar este gráfico, é possível afirmar que um aumento da velocidade de varrimento leva a um aumento da intensidade de corrente e a um deslocamento linear do potencial anódico e catódico para valores mais positivos e mais negativos, respetivamente, apresentado o mesmo comportamento que no sensor não modificado.

Para proceder a uma melhor análise da resposta do sensor perante a variação da velocidade de varrimento, foi estudada a variação dos valores de corrente de pico em função da variação da raiz quadrada da velocidade de varrimento tal como apresentado no Gráfico 22.

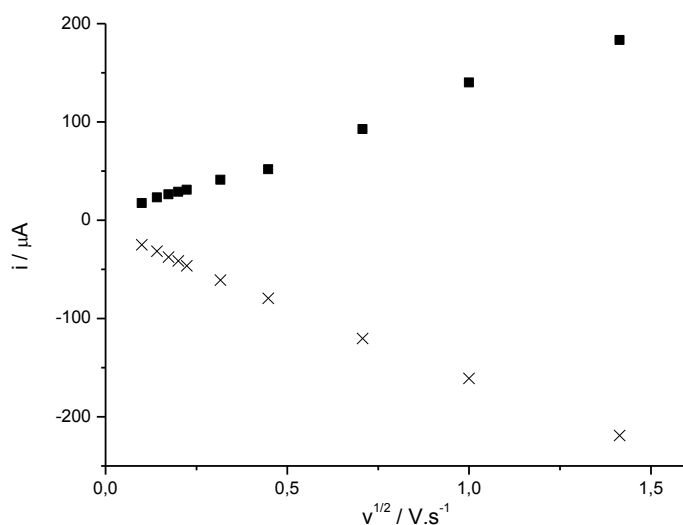


Gráfico 22 – Variação do valor de corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento. Solução 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. ■ Pico anódico. × Pico catódico.

Pode-se observar que, tal como no caso do sensor não modificado, a corrente de pico anódica desloca-se para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varrimento e a corrente de pico catódico desloca-se para valores mais negativos com o aumento da velocidade de varrimento apesar de não ser uma relação proporcional, o que corresponde ao comportamento descrito por uma reação *quasi*-reversível [42].

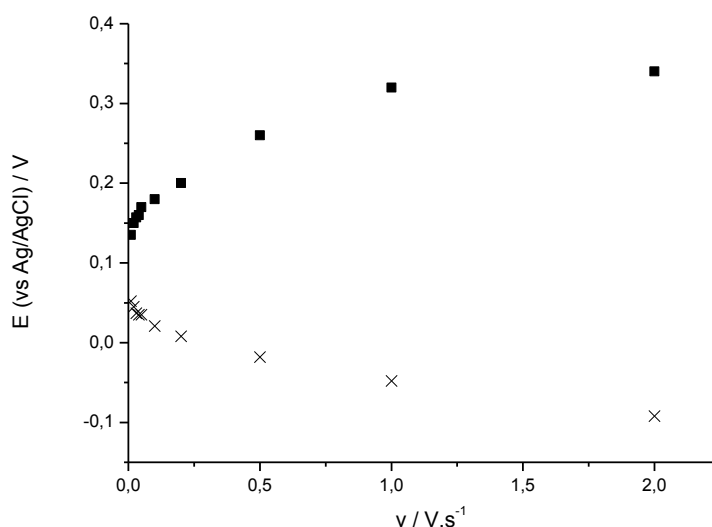


Gráfico 23 – Variação dos valores de potencial dos picos anódico e catódico em função da velocidade de varrimento. Solução 2,5 mM hexacianoferrato(III) de potássio em 0,1 M PBS pH=7,4. ■ Pico anódico. x Pico catódico.

Este gráfico apresenta um comportamento muito semelhante ao Gráfico 16, ou seja, a variação do potencial depende da velocidade de varrimento da reação. Os valores de potencial de pico anódico deslocam-se para valores mais positivos à medida que se aumenta a velocidade de varrimento e os valores de potencial de pico catódico deslocam-se para valores mais negativos, indicativo de que a reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do eletrodo aumenta à medida que se diminui a velocidade de varrimento.

6.1.4. Detecção de H_2O_2

O objetivo da modificação da tinta à base de carbono com CoPC seria tornar possível a detecção de H_2O_2 pelo sensor impresso. Isto porque a cinética da reação do peróxido de hidrogénio é muito lenta, sendo necessário aplicar uma sobretensão para ocorrer. Assim, uma opção é a utilização de mediadores de eletrões tal como CoPC. O H_2O_2 em solução leva à redução de CoPC, sendo Co(I) um dos produtos da reação. O

composto obtido é reoxidado electroquimicamente, sendo possível obter um sinal electroquímico, o sinal de interesse.

Para confirmar que o sensor, com o eléctrodo de trabalho impresso com tinta à base de carbono misturada com CoPC, estava a detetar o H_2O_2 foram feitos estudos electroquímicos com sensores modificados e não modificados, analisando a sua resposta electroquímica numa solução com H_2O_2 , tal como apresentado no Gráfico 24.

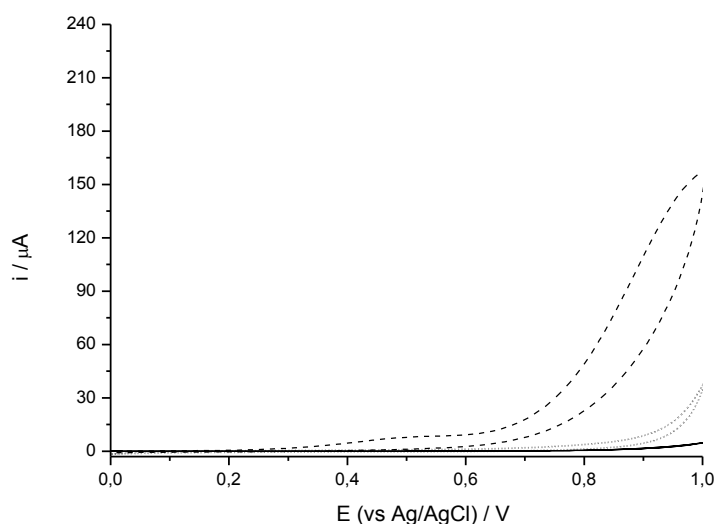


Gráfico 24 – Detecção de 0,88 mM H_2O_2 em 0,1 M PBS pH=7,4. — Sensor não modificado em 0,88 mM H_2O_2 em 0,1 M PBS pH=7,4. Sensor modificado em 0,1 M PBS pH=7,4. - - - - Sensor modificado com CoPC, em 0,88 mM H_2O_2 em 0,1 M PBS pH=7,4, com pico anódico a 0,50 V. Velocidade de varrimento = 0,1 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Este gráfico mostra que antes da modificação da tinta, não é possível observar um sinal electroquímico bem definido. Mas após essa modificação há a deteção de um pico electroquímico, resultante da oxidação electroquímica de CoPC a um potencial de 0,50 V. Este resultado comprova que a CoPC é um bom mediador redox da reacção de oxidação do peróxido de hidrogénio, mediando a transferência de electrões entre o sensor e o analito.

Tal como referido anteriormente, os sensores electroquímicos são maioritariamente sensores cronoamperométricos (secção 2.2.1.b), ou seja, são utilizados para analisar a intensidade de corrente em função da concentração de H_2O_2 . O objetivo é que a intensidade do sinal electroquímico seja diretamente proporcional à concentração de analito presente na solução, sendo para isso necessário que o sensor tenha uma resposta linear a adições sucessivas de H_2O_2 . Dessa forma, foram feitos estudos cronoamperométricos com um dos sensores modificados desenvolvidos, tal como apresentado no Gráfico 25.

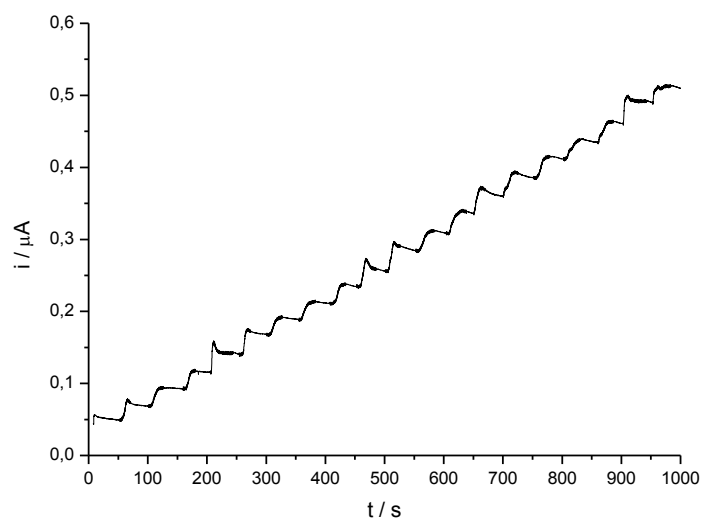


Gráfico 25 – Sinal amperométrico do sensor após sucessivas adições padrão de H_2O_2 (10 μL de 4,85 mM) a 30 mL de 0,1 M PBS pH=7,4. Potencial aplicado de 0,3 V vs Ag/AgCl.

Em estudos similares descritos por M. Boujtita et al. [24], o potencial eletroquímico aplicado foi de 400 mV, mas ao realizar-se o estudo com esse potencial, verificou-se um forte decaimento da intensidade de corrente ao longo tempo, pelo que foram testados outros potenciais, sendo os melhores resultados aqueles obtidos para 300 mV.

Seguidamente foi traçado o gráfico do valor da intensidade de corrente em função da concentração da H_2O_2 , apresentado no Gráfico 26.

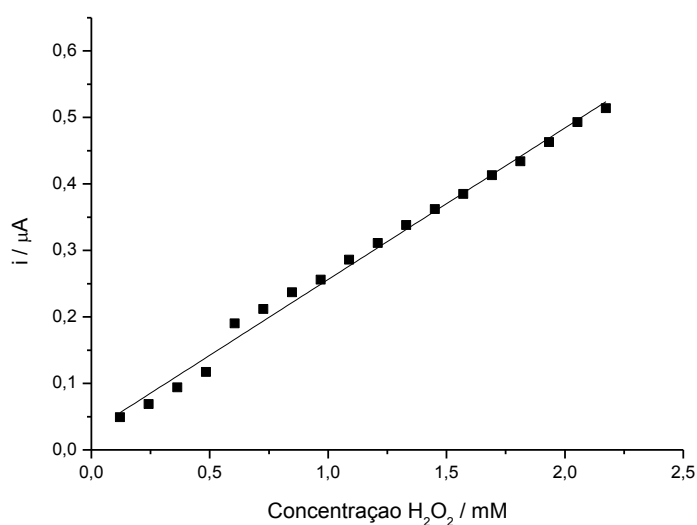


Gráfico 26 – Curva de calibração do sinal amperométrico do sensor após sucessivas adições padrão de H_2O_2 (10 μL de 4,85 mM) a 30 mL de 0,1 M PBS pH=7,4. Potencial Aplicado de 0,3 V vs Ag/AgCl.

Por este gráfico e aplicando uma regressão linear obteve-se a equação de reta $i = (228 \pm 5) [H_2O_2] + (0,028 \pm 0,006)$, com um R^2 de 0,99. Comprova-se assim que o sensor tem uma resposta linear às adições sucessivas de H_2O_2 .

6.2. Álcool Oxidase

Após ter sido otimizada a resposta do sensor para com o complexo CoPC, foi feito o estudo da modificação do sensor com a enzima álcool oxidase. O objetivo seria a detecção de etanol após uma série de reações químicas e eletroquímicas, onde seria obtido o sinal eletroquímico da oxidação de Co(I). Ao adicionar etanol à solução a analisar, este seria oxidado pela enzima álcool oxidase, produzindo peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio iria sofrer uma reação de eletrocatalização pela ftalocianina de cobalto(II), que fora misturado na tinta à base de carbono, formando Co(I). Por fim, o Co(I) seria oxidado electroquimicamente e seria este o sinal detetado.

Este estudo dividiu-se em três partes distintas, uma em que a imobilização da enzima se fazia por uma simples deposição por gota sobre o elétrodo de trabalho impresso, sendo o sensor utilizado após a gota secar, outra em que sobre a gota seca ainda se colocava uma membrana de nitrocelulose e, por fim, um estudo em que após a imobilização da enzima se depositava uma solução de ágar-ágar para impedir a solubilização da enzima na solução a analisar.

A imobilização da enzima sobre o elétrodo de trabalho é visível a olho nu, tal como é observado na Figura 31. Inicialmente tem-se o sensor modificado com ftalocianina de cobalto(II) sem enzima (A), em que é colocada uma gota de uma solução de enzima (B) observando-se, após secar, a formação de uma película transparente e brilhante à superfície do elétrodo de trabalho. A modificação e a secagem é bem visível a olho nu, tal como se pode observar pelas fotografias apresentadas.

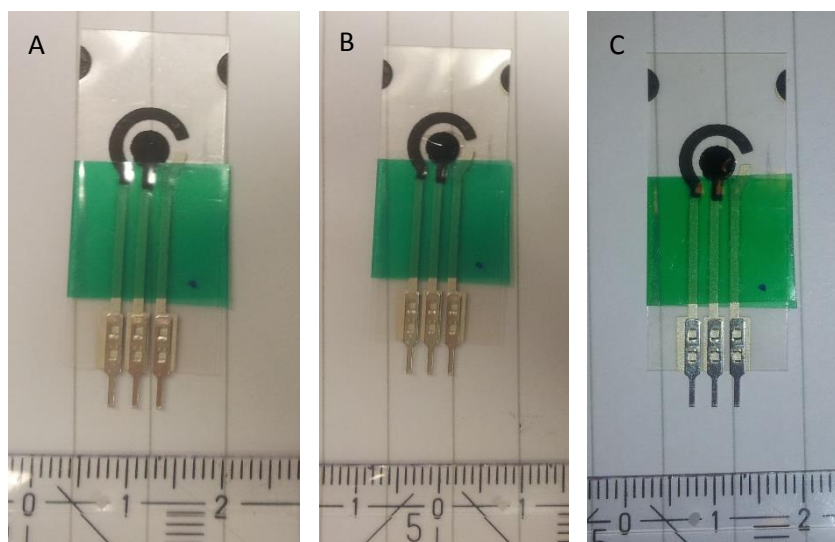


Figura 31 – Sensor de três elétrodos. A – Modificado com CoPC. B – Modificado com AOX, por secar. C – Modificado com AOX, após secagem.

6.2.1. Detecção de Etanol

Foi realizado um estudo do sensor por cronoamperometria, em que se procedia a sucessivas adições padrão de uma solução de 1 M etanol. Mas, após a adição do biossensor na solução com analito, não havia obtenção de sinal e, à medida que se ia adicionando alíquotas de uma solução de etanol, não se verificava aumento da intensidade de corrente. O sinal obtido por esse método foi nulo, sendo possível observar que, após mergulhar o sensor na solução aquosa, esta solução removia a enzima da superfície do elétrodo de trabalho, daí a inexistência de sinal.

De acordo com M. Boujtita et al. [24], a membrana de nitrocelulose usada por estes é apenas utilizada para impedir a intervenção de interferentes, tal como outras substâncias que podem alterar ou impedir o sinal eletroquímico do sensor. Apesar de estes autores referirem que a membrana utilizada era opcional, existiam outros em que esta era importante [56], tendo-se realizado ensaios com esta membrana sobre o elétrodo modificado com a enzima. Numa primeira análise obteve-se sinal, mas este não era linear. A repetibilidade também era nula, porque a imobilização da enzima podia ou não ocorrer, mesmo com a membrana.

Provavelmente, apesar do método descrito por Boujtita et al.[24] ter sido o utilizado, possivelmente a tinta de carbono utilizada no sensor por eles descrito deveria ter uma maior porosidade e ser mais específica para materiais biológicos. Essa maior porosidade e especificidade permitiria que a enzima adsorvesse melhor à superfície do elétrodo de trabalho.

Assim uma nova fase exploratória neste trabalho foi o estudo de um novo processo de imobilização da enzima. Na literatura são referidos diversos polímeros

cuj a polimerização ocorre após a aplicação de um potencial eléctrico (eletropolimerização) [57–59]. Também é referida a imobilização de enzimas utilizando agarose, ou como é conhecida diariamente, ágar-ágar [60, 61]. Este é um composto que gelifica a baixas temperaturas, permitindo a imobilização de enzimas sem grandes alterações na sua estrutura, pois é um composto não tóxico e biologicamente inerte.

Inicialmente colocavam-se 5 μL de solução com AOX sobre o eléctrodo e após este estar seco depositava-se, gota a gota, uma solução diluída em 0,1 M PBS pH=7,4 de ágar-ágar, realizando-se de seguida o estudo cronoamperométrico por adição padrão. Entre os diversos estudos realizados por cronoamperometria, o maior sinal obtido foi ao adicionar etanol puro 99,5%, em pequenos volumes, tal como apresentado no Gráfico 27. As restantes respostas, a menores concentrações de etanol, foram desprezáveis.

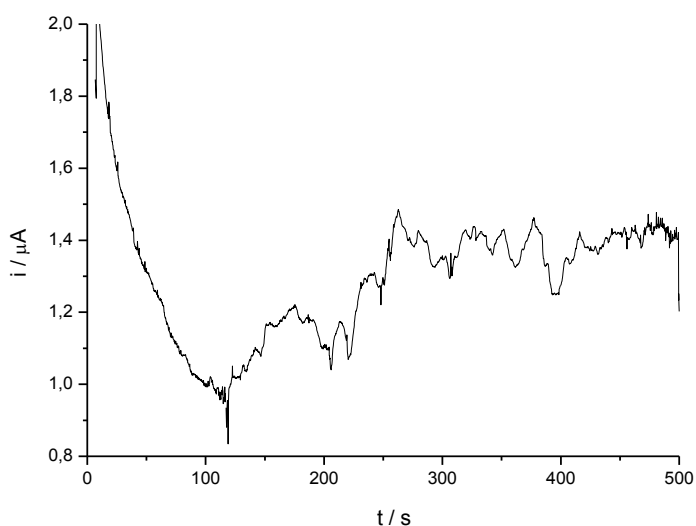


Gráfico 27 – Curva de calibração do sinal amperométrico do sensor após sucessivas adições padrão de etanol (10 μL de 17 M) a 20 mL de 0,1 M PBS pH=7,4, de 100 em 100 s. Potencial aplicado de 0,4 V vs Ag/AgCl.

De acordo com o gráfico apresentado, apenas duas das adições realizadas, aos 100 s e 200 s, foram detetadas pelo sensor. Este sensor apenas deteta elevadas concentrações de etanol e, sendo a sensibilidade uma das características fundamentais de um sensor eletroquímico, diferentes técnicas de imobilização teriam que ser estudadas com um maior foco. Apesar de a solução de ágar-ágar imobilizar a solução de enzima sobre o sensor, esta poderá estar a diminuir a sensibilidade desse sensor. Teriam que ser estudados diversos métodos de funcionalização de enzimas (secção 2.1.5), que poderiam passar por alteração da tinta à base de carbono utilizada por uma com maior porosidade ou pela utilização de polímeros para a imobilização da enzima por eletropolimerização.

7. Conclusão

Após este trabalho foi possível concluir que grande parte dos principais objetivos foram atingidos, tendo-se conseguido criar um sensor eletroquímico não modificado, com um comportamento eletroquímico muitíssimo semelhante ao comportamento dos elétrodos comerciais, um sensor modificado com CoPC, com uma resposta linear às adições sucessivas de H_2O_2 e, tendo-se ainda iniciado o estudo de um sensor modificado com AOX para deteção de etanol, um projeto que necessita de um estudo mais aprofundado.

Após os testes realizados foi possível concluir que é sempre importante utilizar uma camada de revestimento para impedir a oxidação da prata, pois o sinal dessa oxidação acaba por mascarar e modificar o sinal de interesse. Os testes de otimização do sensor não modificado permitiram determinar que ao utilizar quatro camadas de tinta à base de carbono no elétrodo de trabalho e no auxiliar, há uma otimização do comportamento eletroquímico do sensor. Os sensores com este número de camadas têm um sinal anódico a valores menos positivos e um pico catódico a valores menos negativos, obtendo um aumento da reversibilidade do processo redox da sonda à superfície do elétrodo.

Foi observada uma otimização do sinal eletroquímico com o aumento da espessura, mas foi o pré-tratamento à base de PBS que permitiu a possível remoção, da superfície do elétrodo de trabalho, de interferentes que diminuem o sinal eletroquímico e, de um possível aumento da rugosidade da superfície do elétrodo de trabalho, o que levou a um aumento da reversibilidade do sistema, tendo valores de potencial muito semelhantes aos de um sensor comercial.

Foram feitos estudos exploratórios de repetibilidade em ambos os sensores, ou seja, nos sensores modificados e nos sensores não modificados, para comprovar a eficiência do pré-tratamento e em que se pode concluir que os primeiros têm uma resposta mais estável, o que provavelmente se deve ao método de mistura da tinta à base de carbono com CoPC. A mistura não deve ser totalmente homogênea, existindo maior quantidade do complexo em determinadas parcelas da tinta. Logo, os sensores com estas parcelas terão um maior sinal eletroquímico do que aqueles que são impressos com partes da tinta com menos CoPC. Também foi possível determinar que a reação entre o elétrodo de trabalho e a sonda eletroquímica tem um comportamento *quasi*-reversível, tanto no sensor não modificado como no sensor modificado [55].

Seguidamente, tentou-se modificar o sensor através da imobilização da enzima AOX sobre a superfície do elétrodo de trabalho, para a deteção eletroquímica de etanol. Inicialmente, foi realizada uma imobilização por gota. Esta técnica não permitia

a imobilização da enzima em meio aquoso, ou seja, mal se mergulhava o biossensor numa solução aquosa, a enzima imobilizada ficava diluída e ia para a solução. Tentou-se utilizar ainda uma membrana de nitrocelulose para impedir este fenómeno, mas o mesmo continuou a ser observado. Provavelmente por a porosidade do carbono, nos sensores utilizados neste trabalho, não ser igual à dos sensores utilizados na literatura, não imobilizando totalmente a enzima, ou devido a um problema no tamanho de poro da membrana, não sendo este o indicado para este estudo.

Seguidamente, tentou-se imobilizar a enzima usando uma solução gelificante de ágar-ágar. Este método, descrito por diversas fontes, utiliza a ação gelificante do ágar-ágar para aprisionar a enzima, impedindo que esta se dissolva da superfície do sensor. Apesar de se ter obtido sinal, este foi para soluções de analito com concentrações superiores a 8 mM, o que comprova a baixa sensibilidade do sensor, algo muito importante nos sensores eletroquímicos.

No futuro seria necessário efetuar estudos de funcionalização com outros métodos e compostos de imobilização da enzima no sensor e, porventura, alterar a tinta à base de carbono utilizada na impressão, para permitir uma maior porosidade no eletrodo de trabalho, onde ocorre a imobilização.

8. Bibliografia

- [1] A. Morrin, A. J. Killard, and M. R. Smyth, "Electrochemical characterization of commercial and home-made Screen-Printed Carbon electrodes," *Anal. Lett.*, vol. 36, no. 9, pp. 2021–2039, 2003.
- [2] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Electrochemical biosensors.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 5, pp. 1747–63, May 2010.
- [3] A. Koyun, E. Ahlatcioğlu, and Y. K. İpek, "Biosensors and Their Principles," *A Roadmap Biomed. Eng. Milestones*, pp. 117–142, 2012.
- [4] S. P. Mohanty and E. Kougianos, "Biosensors: a tutorial review," *IEEE Potentials*, vol. 25, no. 2, pp. 35–40, Mar. 2006.
- [5] A. M. O. Brett and C. M. A. Brett, *Eletroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações*. Coimbra: Livraria Almedina, 1996.
- [6] DropSens, "Screen printed electrodes." [Online]. Available: http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html. [Accessed: 10-Apr-2015].
- [7] J. Corcuera and R. Cavalieri, "Biosensors," in *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*, New York: Marcel Dekker, 2003, pp. 119–123.
- [8] J. D. Newman, A. P. F. Turner, and G. Marrazza, "Ink-jet printing for the fabrication of amperometric glucose biosensors," *Anal. Chim. Acta*, vol. 262, no. 1, pp. 13–17, 1992.
- [9] E. Karakuş, Ş. Pekyardımcı, and E. Kiliç, "Potentiometric glucose determination in human serum samples with glucose oxidase biosensor based on iodide electrode," *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 49, no. 2, pp. 194–198, 2013.
- [10] J. Santos, "Imobilização da Enzima Glicose Oxidase em Filmes Nanoestruturados para Aplicação em Biossensores," Universidade de São Paulo, 2012.
- [11] C. Hung Tzang, R. Yuan, and M. Yang, "Voltammetric biosensors for the determination of formate and glucose-6-phosphate based on the measurement of dehydrogenase-generated NADH and NADPH," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 3, pp. 211–219, May 2001.
- [12] C. Lehmann, U. Wollenberger, R. Brigelius-flohe, and F. W. Scheller, "Modified Gold Electrodes for Electrochemical Studies of the Reaction of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase with Glutathione and Glutathione Disul ® de," vol. 5, no. 5, pp. 364–369, 2001.
- [13] K. Kahn, P. Serfozo, and P. A. Tipton, "Identification of the True Product of the Urate Oxidase Reaction," vol. 7863, no. 11, pp. 5435–5442, 1997.

- [14] S. Ito, T. Kato, K. Shinpo, C. M. Science, E. M. Mushroom, C. Co, and W. P. C. Indus-, "Oxidation of tyrosine residues in proteins by tyrosinase," vol. 222, pp. 407–411, 1984.
- [15] H. B. Yildiz and L. Toppare, "Biosensing approach for alcohol determination using immobilized alcohol oxidase," vol. 21, pp. 2306–2310, 2006.
- [16] O. Fatibello-Filho, K. Lupetti, O. Leite, and I. Vieira, "Electrochemical Biosensors based on vegetables tissues and crude extracts for environmental, food and pharmaceutical analysis," in *Electrochemical Sensor Analysis*, 207AD, pp. 357 – 377.
- [17] S. Yabuki, H. Shinobara, Y. Ikariyama, and M. Aizawa, "Electrical activity controlling system for a mediator-coexisting alcohol dehydrogenase -NAD conductive membrane," vol. 217, pp. 179–187, 1990.
- [18] T. Nakaminami, S. Kuwabata, H. Yoneyama, and C. Kinetic, "Electrochemical Oxidation of Cholesterol Catalyzed by Cholesterol Oxidase with Use of an Artificial Electron Mediator," vol. 69, no. 13, pp. 2367–2372, 1997.
- [19] S. Yao, "A novel glutamine biosensor system based on a conductance-surface acoustic wave frequency response," vol. 0229, no. 94, pp. 413–417, 1995.
- [20] A. J. Killard and M. R. Smyth, "Creatinine biosensors : principles and designs," vol. 7799, no. 00, pp. 433–437, 2000.
- [21] I. Vostiar, J. Tkac, E. Sturdik, and P. Gemeiner, "Amperometric urea biosensor based on urease and electropolymerized toluidine blue dye as a pH-sensitive redox probe," *Bioelectrochemistry*, vol. 56, no. 1–2, pp. 433–437, May 2002.
- [22] H. Sotoyama, Y. Zhu, J. F. Gitzen, F. Xie, and P. T. Kissinger, "Feasibility of ion-pair reversed-phase liquid chromatography / electrochemistry detection for determination of acetylcholine in microdialysates collected without acetylcholinesterase inhibitors on prediction of oral drug absorption and biological activity," vol. 5, no. 1, pp. 37–43, 2005.
- [23] A. A. P. Ferreira, W. Colli, P. I. da Costa, and H. Yamanaka, "Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 1, pp. 175–81, Jul. 2005.
- [24] M. Boujtita, J. P. Hart, and R. Pittson, "Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer," vol. 15, pp. 257–263, 2000.
- [25] S. A. Kuby, *A Study of Enzymes, Volume 1*. CRC Press, 1990.
- [26] L. Gonzalez-Macia, A. Morrin, M. R. Smyth, and A. J. Killard, "Advanced printing and deposition methodologies for the fabrication of biosensors and biodevices.," *Analyst*, vol. 135, no. 5, pp. 845–67, May 2010.

- [27] F. C. Krebs, "Fabrication and processing of polymer solar cells: A review of printing and coating techniques," *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 93, no. 4, pp. 394–412, Apr. 2009.
- [28] J. Sumerel, J. Lewis, A. Doraiswamy, L. F. Deravi, S. L. Sewell, A. E. Gerdon, D. W. Wright, and R. J. Narayan, "Piezoelectric ink jet processing of materials for medical and biological applications.," *Biotechnol. J.*, vol. 1, no. 9, pp. 976–87, Sep. 2006.
- [29] K. Hagen, *Organic Electronics: Materials, Manufacturing, and Applications*. WILEY-VCH Verlag, 2006.
- [30] A. S. G. Reddy, B. B. Narakathu, M. Z. Atashbar, M. Rebros, E. Rebrosova, and M. K. Joyce, "Gravure Printed Electrochemical Biosensor," *Procedia Eng.*, vol. 25, pp. 956–959, Jan. 2011.
- [31] B. B. Narakathu, S. G. a. Reddy, M. Z. Atashbar, E. Rebrosova, M. Rebros, and M. K. Joyce, "A novel gravure printed impedance based flexible electrochemical sensor," *2011 IEEE SENSORS Proc.*, pp. 577–580, Oct. 2011.
- [32] C. Outline, T. F. Process, N. C. Space, F. I. Metering, and F. P. Innovation, "Flexible Packaging," pp. 27–37, 2015.
- [33] C. O. Phillips, S. Govindarajan, S. M. Hamblyn, R. S. Conlan, D. T. Gethin, and T. C. Claypole, "Patterning of antibodies using flexographic printing," *Langmuir*, vol. 28, no. 25, pp. 9878–9884, 2012.
- [34] R.H.Leach, *The Printing Ink Manual*. 1993.
- [35] J. Wang, B. Tian, V. B. Nascimento, and L. Angnes, "Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks," *Electrochim. Acta*, vol. 43, no. 23, pp. 3459–3465, 1998.
- [36] L. Musavi, "Development and Optimization of Gold Nanoparticle-Modified Carbon Electrode Biosensor for Detection of *Listeria monocytogenes*," pp. 0–15, 2011.
- [37] S. Zhang, G. Wright, and Y. Yang, "Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 15, no. 5–6, pp. 273–282, 2000.
- [38] J. Virkki, T. Bj, S. Merilampi, and L. Syd, "Manufacturing and Applications of Screen-printed RFID Tags on Paper Substrate," pp. 562–566, 2013.
- [39] W. S. Wong and A. Salleo, *Flexible Electronics: Materials and Applications Electronic Materials: Science and Technology*. 2009.
- [40] F. Scholz, *Electroanalytical Methods - Guide to Experiments and Applicatios*, Second. New York: Springer, 2010.
- [41] Bio Logic, "Screen printed electrodes." [Online]. Available: <http://www.biologic.info/potentiostat-electrochemistry-ec-lab/accessories/analytical-cell-kit/screen-printed-electrodes/>. [Accessed: 14-May-2015].

- [42] Gwent, "Screen Printed Electrodes." [Online]. Available: http://www.gwent.org/gem_standard_electrodes.html.
- [43] M. Tudorache and C. Bala, "Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 388, no. 3, pp. 565–78, Jun. 2007.
- [44] M. a Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, and M. J. Arcos-Martínez, "Screen-printed biosensors in microbiology; a review.," *Talanta*, vol. 82, no. 5, pp. 1629–36, Oct. 2010.
- [45] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, and K. C. Waldron, "Glutaraldehyde : behavior in aqueous solution , reaction with proteins , and application to enzyme crosslinking," vol. 37, no. 5, 2004.
- [46] P. T. Kissinger, W. Lafayette, and W. R. Heineman, *Cyclic voltammetry*. .
- [47] D. Pletcher, R. Greff, R. Peat, L. M. Peter, and R. J., *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Woodhead Publishing, 2001.
- [48] R. De Queiroz, L. Alberto, I. De Química, D. S. Carlos, U. D. S. Paulo, and S. C. Sp, "Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de sucos de frutas industrializados usando o crac assay," vol. 31, no. 8, pp. 2169–2173, 2008.
- [49] N. Kumar, *Comprehensive Physics XII*. Laxmi Publications, 2003.
- [50] D. K. Schroder, *Semiconductor Material and Device Characterization*, Third., vol. 44, no. 4. WILEY-VCH Verlag, 2006.
- [51] A. Bandyopadhyay and S. Bose, *Characterization of Biomaterials*. 2013.
- [52] G. Cui, J. H. Yoo, J. S. Lee, J. Yoo, J. H. Uhm, G. S. Cha, and H. Nam, "Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes.," *Analyst*, vol. 126, no. 8, pp. 1399–1403, 2001.
- [53] R. M. Wightman, "Methods to Improve Electrochemical Reversibility at Carbon Electrodes," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 131, no. 7, p. 1578, 1984.
- [54] M. Gulppi, J. Pavez, J. H. Zagal, M. Sancy, M. Azocar, F. Scholz, and M. a. Páez, "Stripping voltammetry microprobe (SPV): Substantial improvements of the protocol," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 745, pp. 61–65, 2015.
- [55] "University of Cambridge." [Online]. Available: <http://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/teaching-notes/linear-sweep-and-cyclic-voltammetry-the-principles>. [Accessed: 20-May-2015].
- [56] D. Tanyolaç, B. Işık Yürüksoy, and A. R. Özdural, "Immobilization of a thermostable α -amylase, Termamyl®, onto nitrocellulose membrane by Cibacron Blue F3GA dye binding," *Biochem. Eng. J.*, vol. 2, no. 3, pp. 179–186, 1998.
- [57] S. M. Muhammet, S. Cete, F. Arslan, and A. Yaşar, "Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and aniline in sulphuric Acid

for the determination of cholesterol in serum.,” *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, vol. 37, no. 6, pp. 273–278, 2009.

[58] E. Akyilmaz, O. Kozgus, H. Türkmen, and B. Çetinkaya, “A mediated polyphenol oxidase biosensor immobilized by electropolymerization of 1,2-diamino benzene,” *Bioelectrochemistry*, vol. 78, no. 2, pp. 135–140, 2010.

[59] S. Cosnier, “Electropolymerization of amphiphilic monomers for designing amperometric biosensors,” *Electroanalysis*, vol. 9, no. 12, pp. 894–902, 1997.

[60] S. Tembe, M. Karve, S. Inamdar, S. Haram, J. Melo, and S. F. D’Souza, “Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film,” *Anal. Biochem.*, vol. 349, no. 1, pp. 72–77, 2006.

[61] B. Brena, P. González-Pombo, and F. Batista-Viera, “Immobilization of enzymes: a literature survey.,” *Immobil. Enzym. Cells*, vol. 1051, pp. 15–31, 2013.